



## **TESIS DOCTORAL**

# **“BIOMONITORIZACIÓN DE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO, INFLAMACIÓN, MICROBIOTA INTESTINAL Y DE LA EXPOSICIÓN A METALES PESADOS EN EL TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA EN LA INFANCIA”**

**Autor: Antonio Rafael Gómez Fernández.**

**Directores:**

**Prof. Dr. Juan Luís Pérez Navero.**

**Prof. Dra. Mercedes Gil Campos.**

**DEPARTAMENTO: ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS. ÁREA DE PEDIATRÍA.**

**FACULTAD DE MEDICINA Y ENFERMERÍA.**

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

TITULO: *BIOMONITORIZACIÓN DE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO, INFLAMACIÓN, MICROBIOTA INTESTINAL Y DE LA EXPOSICIÓN A METALES PESADOS EN EL TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA EN LA INFANCIA.*

AUTOR: *Antonio Rafael Gómez Fernández*

---

© Edita: UCOPress. 2020  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/  
ucopress@uco.es](https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es)

---



**TÍTULO DE LA TESIS: BIOMONITORIZACIÓN DE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO, INFLAMACIÓN, MICROBIOTA INTESTINAL Y DE LA EXPOSICIÓN A METALES PESADOS EN EL TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA EN LA INFANCIA**

**DOCTORANDO/A: ANTONIO RAFAEL GÓMEZ FERNÁNDEZ**

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

D. JUAN LUIS PÉREZ NAVERO, con DNI 30.060.508 Z. Prof. Titular de Pediatría, del Departamento de Especialidades Médico-Quirúrgicas de la Facultad de Medicina y Enfermería de la Universidad de Córdoba y Jefe de Servicio de Pediatría, Críticos y Urgencias del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, informa que:

El Doctorando reseñado anteriormente, ha realizado un trabajo de investigación exhaustivo, en relación con la revisión bibliográfica, el material y los métodos, la selección de los pacientes y los controles, así como, en el aprendizaje de las pruebas de campo, clínicas y de laboratorio, abordando las diferentes tecnologías que se han aplicado en este trabajo de investigación. Igualmente, ha aprendido la metodología del análisis estadístico y de la investigación aplicada a valorar los resultados.

El excelente trabajo de investigación llevado a cabo por el Doctorando se pone de manifiesto a través de los artículos publicados derivados de esta Tesis, así como en las comunicaciones presentadas en Congresos Nacionales e Internacionales y en los premios obtenidos. Por todo lo anterior, solicito que D. Antonio Rafael Gómez Fernández, pueda optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba, autorizando la presentación y defensa de su Tesis Doctoral.

Lo que firmo en Córdoba, a 23 de Septiembre de 2019

Fdo.:Juan Luis Pérez Navero



**TÍTULO DE LA TESIS: BIOMONITORIZACIÓN DE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO, INFLAMACIÓN, MICROBIOTA INTESTINAL Y DE LA EXPOSICIÓN A METALES PESADOS EN EL TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA EN LA INFANCIA**

**DOCTORANDO/A: ANTONIO RAFAEL GÓMEZ FERNÁNDEZ**

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Dña. MARIA MERCEDES GIL CAMPOS, con DNI 44286271R, como directora de esta tesis doctoral, Prof. Titular de Pediatría, del Dpto de Especialidades Médico-Quirúrgicas de la Facultad de Medicina, informa que:

Se ha realizado un trabajo de tesis doctoral exhaustivo y de gran calidad. El doctorando ha aprendido metodología de la investigación, y ha trabajado profundamente tanto en el trabajo de selección, clínico y de muestreo, así como en el aprendizaje de pruebas de campo y técnico en diferentes laboratorios abordando distintas tecnologías aplicables a su ámbito profesional y de conocimiento, y en la preparación y redacción de las publicaciones que se exponen en esta tesis doctoral.

Los artículos publicados a partir de esta Tesis, así como comunicaciones en congresos nacionales e internacionales, y varios premios recibidos, indican el excelente trabajo de investigación realizado. Por ello, solicito que el doctorando Antonio Rafael Gómez Fernández pueda optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 23 Septiembre 2019

Firma de la directora

Fdo.: Mercedes Gil Campos

## **AGRADECIMIENTOS**

Este largo y duro camino que supone realizar la tesis, en un mundo tan competitivo como el de la medicina, no hubiera podido en modo alguno haberlo recorrido sin la ayuda de muchas personas. Es por tanto el trabajo no de un doctorando, sino de un verdadero equipo, el que ha hecho posible los logros que a continuación expongo.

Quiero citar en primer lugar, mi mujer, mi gran apoyo. Sin ella ninguno de mis pequeños logros hubieran sido posibles. Nunca nadie, habrá tenido tanto apoyo como el que me ha brindado mi querida esposa, mi compañera, mi consuelo, mi fuente de energía. A ella le debo y cómo no, le dedico, todo el trabajo que a continuación expongo, que durante años, ha supuesto robarme un tiempo precioso que pasar con ella, y por supuesto, con nuestros dos maravillosos hijos. Muchas gracias a los tres, y siento de corazón esos momentos difíciles que he pasado, y que en ocasiones se han visto reflejados en mi carácter, pagando las consecuencias las personas que más quiero, y a las que todo les debo.

Para mis tutores de Tesis, Profesores Juan Luis Pérez Navero y Mercedes Gil Campos solo tengo palabras de agradecimiento; jamás pensé que pudiera recibir tanto apoyo por su parte, y no solo en las numerosas horas de trabajo que hemos compartido, sino especialmente por el apoyo emocional que he recibido de su parte, especialmente cuando en mis peores momentos, he sentido la tentación de abandonar, por el inmenso trabajo que me ha supuesto y lentas recompensas alcanzadas. Os agradezco de todo corazón, cada uno de los consejos que me habéis brindado, fruto de vuestra dilatada experiencia. Os reservo un lugar privilegiado, en lo más profundo de mi corazón. Solo espero, que mi trabajo haya sido de vuestro agrado, y haber estado a la altura de vuestras expectativas, y espero de corazón que me recordéis como un buen doctorando, el cual no ha desperdiciado las numerosas horas que os ha supuesto mi tesis.

A las Dras Maria José de la Torre Aguilar y Katherine Flores-Rojas de las que además de su amistad, he recibido un gran apoyo por su parte, además de un sinfín de horas de trabajo juntos. Gracias de corazón. A Pilar Martín, de la que además de su amistad y gran ayuda, he aprendido gran parte de los

conocimientos sobre la patología de la que trata el presente trabajo. Y por último, al servicio de Anestesia, y especialmente a Pilar Pérez Navero, sin los que no hubiera podido recolectar las muestras de los niños controles.

A todos vosotros por tanto, os dedico este enorme esfuerzo y trabajo, fruto de nuestra colaboración, de nuestra amistad, de la labor de un magnífico equipo de trabajo. Gracias por todo.

Finalmente, quiero hacer una mención especial a todas las familias de pacientes TEA, y a la de los controles, que han aceptado su inclusión en el proyecto, a pesar de que como bien es sabido, los conocimientos adquiridos en este tipo de estudios, suelen originar nuevas líneas de investigación, más que poder dar una respuesta o alguna medida que pueda mejorar el pronóstico de sus hijos. A pesar de ello, todas las familias, tanto las de los controles, sabedoras de que el objetivo principal era ayudar a niños con TEA, como las familias de los pacientes TEA, se ofrecieron generosamente a todo aquello que le habíamos propuesto.

## **RESUMEN**

Esta memoria de tesis doctoral por compendio de artículos publicados en revistas con factor de impacto en los cuartiles 1 y 2, implica a los artículos que se han publicado como resultado de la investigación sobre marcadores de estrés oxidativo, inflamación, microbiota intestinal, exposición a metales pesados en el Trastorno de Espectro Autista (TEA) en la infancia así como los resultados del ensayo clínico para valorar la eficacia del ácido docosaheptaenoico. Además, es el resultado del inicio de una línea de investigación inédita en la Unidad de Investigación Pediátrica del Hospital Universitario Reina Sofía, que seguirá aportando resultados en un futuro próximo. Son por tanto, muchos los subproyectos que se han derivado los cuales, en parte se incluyen en el presente documento, dado que son fruto del mismo esfuerzo y trabajo en equipo que el de los artículos publicados para elaborar la presente tesis doctoral. Es de esperar por tanto, que en los meses o años venideros aparezcan futuras publicaciones similares a las que aquí se exponen. Por tanto no solo se reseñan los resultados de estos años de investigación, sino también los trabajos que actualmente se están llevando a cabo, que se publicarán en un futuro próximo.

### **Contenido de la investigación**

Se han descrito varias teorías etiopatogénicas sobre la alteración en el neurodesarrollo y la sintomatología del TEA, en las que se evalúan los mecanismos inflamatorios, estrés oxidativo y alteraciones metabólicas, en la microbiota intestinal o incluso tras la exposición a metales pesados. Por ello, se realizó un estudio de casos y controles, de pacientes TEA en edad preescolar y controles sanos de la misma edad y desarrollo neurológico típico. El grupo de pacientes TEA se clasificaron en función de la presencia o ausencia de regresión del neurodesarrollo, mediante una escala diseñada para tal fin, y basada en la descripción de la regresión de la Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R). Se determinaron en muestras de sangre periférica en los grupos de estudio los principales indicadores de inflamación y estrés oxidativo así como los principales metabolitos y el perfil metabolómico. Además, se llevó a cabo en muestras fecales, la determinación de la microbiota intestinal, mediante un estudio metagenómico para comparar los tres grupos.

## **Resultados**

En relación con los marcadores inflamatorios, se observaron niveles más altos del Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) en el grupo TEA en comparación con el grupo control. En el análisis de los subgrupos de TEA, se encontraron niveles más bajos en plasma de la molécula NCAM y niveles más elevados de NGF en el grupo de niños TEA sin regresión en el neurodesarrollo. Por otro lado, detectamos niveles más elevados de Actinobacteria, Proteobacteria y Bacilli, además de Erysipelotrichi y Gammaproteobacteria en heces de niños TEA en comparación con el grupo control. Los pacientes con regresión en el neurodesarrollo presentaron niveles más altos de proteobacterias. De igual modo, hallamos diferencias significativas en los perfiles metabolómicos implicados en el metabolismo de los aminoácidos, lípidos y nicotinamida entre el grupo TEA y control y entre ambos subgrupos de TEA con y sin neuroregresión.

## **Conclusiones**

Nuestros resultados indican que en el desarrollo del TEA podrían estar involucrados diferentes mecanismos etiopatogénicos, y que incluso dentro del amplio espectro de pacientes que representa el TEA, podrían existir diferentes subgrupos de TEA con distinta fisiopatología. Se necesitarían realizar estudios multicéntricos amplios que trataran de profundizar más en los diferentes mecanismos fisiopatológicos implicados en el desarrollo del TEA, así como en los diferentes subgrupos de niños con TEA, para poder desarrollar dianas terapéuticas específicas.



## **ABSTRACT**

### **Background**

This doctoral thesis report by compendium of articles published in journals with impact factor in quartiles 1 and 2, implies a result of research on markers of oxidative stress, inflammation, intestinal microbiota, or metal exposure in Autism Spectrum Disorder (ASD) in childhood as well as the results of the clinical trial to assess the efficacy of docosahexaenoic acid supplementation. In addition, it is the result of the beginning of a new research line in the Pediatric Research Unit of the Reina Sofía University Hospital, which will continue to provide results in the near future. Therefore, there are many subprojects that have been developed which, in part, are included in this document, since they are the result of the same effort and team work. So, not only the results of these years of research are reviewed, but also the works that are currently being carried out, which will be published in the near future.

### **Research Content**

Several etiopathogenic theories about neurodevelopmental alteration and ASD symptomatology have been described, in which inflammatory mechanisms, oxidative stress and metabolic alterations are evaluated in the intestinal microbiota or even after exposure to heavy metals. So, a case-control study of ASD patients in preschool age and healthy controls of the same age and typical neurological development was performed. The group of ASD patients was classified according to the presence or absence of neurodevelopmental regression, using a scale designed for this purpose, and based on the description of the regression of the Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R). The main indicators of inflammation and oxidative stress as well as the main metabolites and metabolomic profile were determined in peripheral blood samples in the study groups. In addition, the determination of the intestinal microbiota was carried out in faecal samples by means of a metagenomic study, comparing both groups.

### **Results**

In relation to inflammatory markers, higher levels of the Nerve Growth Factor

(NGF) were observed in the ASD group compared to the control group. In the analysis of the subgroups of ASD, lower plasma levels of the NCAM molecule and higher levels of NGF were found in the group of ASD children without regression in neurodevelopment. On the other hand, we detected higher levels of Actinobacteria, Proteobacteria and Bacilli, in addition to Erysipelotrichi and Gammaproteobacteria in feces of ASD children compared to the control group. Patients with neurodevelopmental regression showed higher levels of Proteobacteria. Similarly, significant differences in the metabolomic profiles involved in the metabolism of amino acids, lipids and nicotinamide between the ASD and control group and between both ASD subgroups with and without neuroregression, were found.

## **Conclusions**

Our results indicate that different etiopathogenic mechanisms may be involved in the development of ASD, and that even within the broad spectrum of patients represented by ASD, there may be different subgroups of ASD with different pathophysiology. Extensive multicentric studies would be needed to try to investigate more in the different pathophysiological mechanisms involved in the development of ASD, as well as in the different subgroups of ASD, in order to develop specific therapeutic targets

## ABREVIATURAS

### A

AA: acontecimiento adverso  
AAG: acontecimiento adverso grave  
ABC: the aberrant behavior checklist  
ABTS: 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid  
Ac: anticuerpos  
ADDM: autism and developmental disabilities monitoring  
ADIR-R: the autism diagnostic interview-revised  
ADOS-2: the autism diagnostic observation schedule-2  
ALA: ácido  $\alpha$ -linolénico  
ALT: alanina aminotransferasa  
AMR: autism mental regression  
ANMR: autism no mental regression  
APA: american psychiatric association  
AST: aspartato aminotransferasa  
ATP: adenosín trifosfato

### B

BASC-2: the behavior assessment system for children-2  
BDNF: brain-derived neurotrophic factor  
BEDCA: base de datos española de composición de alimentos  
BHE: barrera hematoencefálica  
BLAST: basic local alignment search tool

### C

CARS: the childhood autism rating scale  
CD: cluster of differentiation  
Cd: cadmio  
CDC: centers for disease control and prevention  
CGI-I: the clinical global impressions-improvement  
CMH: complejo mayor de histocompatibilidad  
CIE-10: clasificación internacional de enfermedades, décima versión  
CSF: colony-stimulating factor

### D

DHA: ácido docosaexaenoico  
DPA: ácido docosapentaenoico  
DMSA: ácido dimercaptosuccínico  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
DSM-4: diagnostic and statistical manual of mental disorders, cuarta versión  
DSM-4-TR: diagnostic and statistical manual of mental disorders, cuarta versión, versión revisada  
DSM-5: diagnostic and statistical manual of mental disorders, quinta versión

### E

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
EFSA: autoridad europea para la seguridad de los alimentos  
EN ISO: europea+internacional  
EPA: ácido eicosapentaenoico

4-EPS: 4-ethylphenylsulfate  
ERO: especie reactiva de oxígeno

F  
FA: fatty acids

G  
G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor  
GFAP: glial fibrillary acidic protein  
GGT: gamma-glutamyl transferase  
GI: gastrointestinal  
GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor  
GPRD: general practice research database  
GR: glutathione reductase  
GSH: glutathione  
GSH-PX: glutathione peroxidase  
GSSG: glutathione disulfide  
GSSGR: glutathione reductase

H  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peroxide of hydrogen  
HDL: high density lipoprotein  
Hg: mercury  
HLA: human leukocyte antigen  
HPLC: chromatography liquid of high resolution  
HURS: hospital universitario reina sofía

I  
IFN: interferon  
Ig: immunoglobulin  
IL: interleukin  
IMC: index of body mass  
IMIBIC: instituto maimónides de investigación biomédica de córdoba

L  
LAK: lymphokine-activated killer  
LC-PUFA: polyunsaturated fatty acids of long chain  
LCR: cerebrospinal fluid  
LDL: low density lipoproteins  
LTC: cytotoxic T lymphocyte

M  
MAC: membrane attack complex  
MCP-1: monocyte chemoattractant protein 1  
MDA: malondialdehyde  
MIA: maternal immune activation  
Mn: manganese  
MPO: myeloperoxidase

## N

NAD: nicotin adenin dinucleótido

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NCAM: neural cell adhesion molecule

NFG: factor de crecimiento nervioso

NF-KB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated b cells

NK: natural killer

## O

OMS: organización mundial de la salud

OTU: unidad taxonómica operativa

## P

PAI-1: factor inhibidor del plasminógeno 1

Pb: plomo

Pb: pares de bases

PBMC: peripheral blood mononuclear cell

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDDBI: the pervasive developmental disorders behavioral inventory

## R

RANTES: regulated on activation, normal t cell expressed and secreted

RDP: ribosomal data project

RNA: ácido ribonucleico

## S

SA: síndrome de angelman

SDQ: the strengths and difficulties questionnaire

SICAM: soluble intercellular adhesion molecule-1

SNC: sistema nervioso central

SOD: supeóxido dismutasa

SPSS: statistical package for the social sciences

SPW: síndrome de prader-willi

SVCAM-1: soluble vascular cell adhesion molecule-1

SXF: síndrome del x frágil

## T

TBARS: thiobarbituric acid reactive substances

TDAH: trastorno por déficit de atención e hiperactividad

TEA: trastorno del espectro autista

TGF- $\beta$ 1: transforming growth factor beta 1

Th: linfocito t helper

TNF: tumor necrosis factor

## U

UNESCO: organización de las naciones unidas para la educación, la ciencia y la cultura

USMIJ: unidad de salud mental infantil y juvenil



## **ÍNDICE**

### **1 INTRODUCCIÓN**

#### **1.1 Historia y definición**

#### **1.2 Epidemiología**

#### **1.3 Clasificación del Trastorno del Espectro Autista**

#### **1.4 Etiopatogenia en el Trastorno del Espectro Autista primario**

##### **1.4.1 Inflamación**

##### **1.4.2 Estrés oxidativo**

##### **1.4.3 Perfil metabolómico**

##### **1.4.4 Metales Pesados**

##### **1.4.5 Microbiota intestinal**

##### **1.4.6 Ácidos grasos poliinsaturados**

### **2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

### **3 MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 Diseño de los estudios**

#### **3.2 Sujetos de estudio**

#### **3.3 Historia clínica, exploración física, antropometría y encuesta nutricional**

#### **3.4 Extracción sanguínea y análisis bioquímicos en plasma y eritrocitos**

#### **3.5 Análisis de la microbiota intestinal**

#### **3.6 Estudio de metales pesados en cabello y orina**

#### **3.7 Análisis estadístico**

#### **3.8 Aspectos éticos**

### **4 RESULTADOS**

### **5 BIBLIOGRAFÍA**

### **6 ANEXOS**

### **7 OTRA PRODUCCIÓN CIENTÍFICA Y RECONOCIMIENTOS**

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Historia y definición

El concepto de “autismo” (del griego eafismos: encerrado en uno mismo), fue introducido en el campo de la psicopatología por primera vez en 1911, cuando un psiquiatra alemán, Eugen Bleuer, describió un síntoma observado en los casos más severos de esquizofrenia, concepto que también había definido. El autismo se caracteriza según él por el repliegue de la vida mental sobre sí misma, constituyendo así un mundo cerrado, separado de la realidad exterior y por la dificultad extrema o la imposibilidad de comunicarse con los demás. Pero Bleuer, no solo hace referencia al autismo como síntoma, si no que habla del “pensamiento autista”, que según él tiene su origen en una mente esquizofrénica, y por tanto fragmentada, y caracterizado por los deseos infantiles de evitar realidades insatisfactorias y reemplazarlas con fantasías y alucinaciones (Evans, 2013).

Hace más de 70 años que un médico austríaco, Léo Kanner, estudiando a un grupo de niños diagnosticados de esquizofrenia infantil, describió en su trabajo “Autistic Disturbance of Affective Contact” (1943), a un grupo de 11 niños pequeños, la mayoría varones, que presentaban una serie de alteraciones comunes que consistían en un retraso o ausencia en la adquisición del lenguaje, incapacidad para relacionarse con las personas e insistencia obsesiva por mantener el ambiente sin cambios, y con tendencia a realizar ritualizaciones. Lo denominó “autismo infantil precoz” por la edad temprana de su aparición, y realizó una detallada descripción de las características comunes, algunas de las cuales continúan siendo referencia hoy en día para definir al autismo.

Casi de forma simultánea, en 1944 un pediatra austríaco, Hans Asperger describió un grupo de niños con características similares a las descritas por Kanner. En su trabajo “Die Autistische Psychopathen in Kindersalter”, que trascendería años después debido a la ocupación nazi de Austria, determinó como características centrales de la “psicopatología autista” la limitación en las relaciones sociales, extrañas pautas comunicativas y un importante carácter obsesivo en sus acciones y pensamientos. Pese a utilizar el término “autista”, se diferenciaba del “autismo infantil precoz” de Kanner en



la conservación del lenguaje, del desarrollo cognitivo y mayor edad de presentación. Años más tarde, cuando preguntaron a los dos autores si la patología que habían descrito casi de forma simultánea se correspondía en realidad de la misma entidad nosológica, ambos estuvieron de acuerdo en que se trataba de dos patologías completamente diferentes pese a la referencia común de la psicopatología autista. De hecho, durante muchos años, ambos síndromes se encontraron en la misma categoría (Trastornos Generalizados del Desarrollo) tanto en la CIE-10 (Clasificación Internacional de Enfermedades de la OMS, décima versión) como en el DSM-4 (DSM: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder) de la Asociación Americana de Psiquiatría (APA) (Tabla 1) (OMS, 1992; APA 1994) e incluso en la versión revisada del DSM-4 (APA, 2000).

**Tabla 1.** Trastornos generalizados del desarrollo

<b>CIE-10</b>
- F84.0 Autismo infantil
- F84.1 Autismo atípico
- F84.2 Síndrome de Rett
- F84.3 Otro trastorno desintegrativo de la infancia
- F84 Hiperactividad asociada a un retraso mental y a movimientos estereotipados
- F84.5 Síndrome de Asperger
- F84.8 Otros trastornos invasores del desarrollo
- F84.9 Otros trastornos invasores del desarrollo no precisados
<b>DSM-4</b>
- 299 Trastorno Autista
- 299.10 Trastorno desintegrativo de la infancia
- 299.80 Síndrome de Rett
- 299.80 Síndrome de Asperger
- 299.80 Otros trastornos invasores del desarrollo no especificados en otro lugar

Tomado de CIE-10 y DSM-4

Durante décadas, se ha mantenido vigente la descripción que ofreciera Kanner para definir a los síntomas nucleares del autismo, el fracaso en las relaciones personales, intereses restringidos y estereotipados y alteraciones en la comunicación, los cuales quedan reflejados en los criterios diagnósticos del DSM-4-TR para Trastorno Autista y Síndrome Asperger (Tablas 2 y 3).

**Tabla 2.** DSM-4-TR Criterios diagnósticos de Trastorno Autista

<p><b>A. Existe un total de 6 (o más) ítems de 1, 2 y 3, con por lo menos dos de 1, y uno de 2 y de 3:</b></p> <p><b>1. Alteración cualitativa de la interacción social, manifestada al menos por dos de las siguientes características:</b></p> <p>(a) Importante alteración del uso de múltiples comportamientos no verbales, como son contacto ocular, expresión facial, posturas corporales y gestos reguladores de la interacción social</p> <p>(b) Incapacidad para desarrollar relaciones con compañeros adecuadas al nivel de desarrollo</p> <p>(c) Ausencia de la tendencia espontánea para compartir con otras personas disfrutes, intereses y objetivos (p. ej., no mostrar, traer o señalar objetos de interés)</p> <p>(d) Falta de reciprocidad social o emocional</p> <p><b>2. Alteración cualitativa de la comunicación manifestada al menos por dos de las siguientes características:</b></p> <p>(a) Retraso o ausencia total del desarrollo del lenguaje oral (no acompañado de intentos para compensarlo mediante modos alternativos de comunicación, tales como gestos o mímica)</p> <p>(b) En sujetos con un habla adecuada, alteración importante de la capacidad para iniciar o mantener una conversación con otros</p> <p>(c) Utilización estereotipada y repetitiva del lenguaje o lenguaje idiosincrásico</p> <p>(d) Ausencia de juego realista espontáneo, variado, o de juego imitativo social propio del nivel de desarrollo</p> <p><b>3. Patrones de comportamiento, intereses y actividades restringidos, repetitivos y estereotipados, manifestados por lo menos mediante una de las siguientes características:</b></p> <p>(a) Preocupación absorbente por uno o más patrones estereotipados y restrictivos de interés que resulta anormal, sea en su intensidad, sea en su objetivo</p> <p>(b) Adhesión aparentemente inflexible a rutinas o rituales específicos, no funcionales</p> <p>(c) Manierismos motores estereotipados y repetitivos (p. ej., sacudir o girar las manos o dedos, o movimientos complejos de todo el cuerpo)</p> <p>(d) Preocupación persistente por partes de objetos</p> <p><b>B. Retraso o funcionamiento anormal en por lo menos una de las siguientes áreas, que aparece antes de los 3 años de edad: 1 interacción social, 2 lenguaje utilizado en la comunicación social o 3 juego simbólico o imaginativo</b></p> <p><b>C. El trastorno no se explica mejor por la presencia de un trastorno de Rett o de un trastorno desintegrativo infantil</b></p>
--

**Tabla 3.** DSM-4-TR: Criterios diagnósticos de Síndrome de Asperger

<p><b>A. Alteración cualitativa de la interacción social, manifestada al menos por dos de las siguientes características:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Importante alteración del uso de múltiples comportamientos no verbales como contacto ocular, expresión facial, posturas corporales y gestos reguladores de la interacción social</li> <li>2. Incapacidad para desarrollar relaciones con compañeros apropiadas al nivel de desarrollo del sujeto</li> <li>3. Ausencia de la tendencia espontánea a compartir disfrutes, intereses y objetivos con otras personas (p.ej., no mostrar, traer o enseñar a otras personas objetos de interés)</li> <li>4. Ausencia de reciprocidad social o emocional</li> </ol> <p><b>B. Patrones de comportamiento, intereses y actividades restrictivos, repetitivos y estereotipados, manifestados al menos por una de las siguientes características:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Preocupación absorbente por uno o más patrones de interés estereotipados y restrictivos que son anormales, sea por su intensidad, sea por su objetivo</li> <li>2. Adhesión aparentemente inflexible a rutinas o rituales específicos, no funcionales</li> <li>3. Manierismos motores estereotipados y repetitivos (p. ej., sacudir o girar manos o dedos, o movimientos complejos de todo el cuerpo)</li> <li>4. Preocupación persistente por partes de objetos</li> </ol> <p><b>C. El trastorno causa un deterioro clínicamente significativo de la actividad social, laboral y otras áreas importantes de la actividad del individuo</b></p> <p><b>D. No hay retraso general del lenguaje clínicamente significativo (p. ej., a los 2 años de edad utiliza palabras sencillas, a los 3 años de edad utiliza frases comunicativas)</b></p> <p><b>E. No hay retraso clínicamente significativo del desarrollo cognoscitivo ni del desarrollo de habilidades de autoayuda propias de la edad, comportamiento adaptativo (distinto de la interacción social) y curiosidad acerca del ambiente durante la infancia</b></p> <p><b>F. No cumple los criterios de otro trastorno generalizado del desarrollo ni de esquizofrenia</b></p>
---

Sin embargo, el último manual de diagnóstico DSM-5 (APA, 2013) presenta notables diferencias en cuanto a la definición y clasificación de autismo, pasando a denominarse "Trastorno del Espectro Autista", eliminándose todas las categorías diagnósticas englobadas en el DSM-4-TR dentro de los "Trastornos Generalizados del Desarrollo" (Síndrome de Asperger, Síndrome de Rett, Trastorno Autista, Trastorno Desintegrativo de la Infancia y Trastorno Generalizado del Desarrollo no especificado). Estos cambios pretenden reflejar la amplia heterogeneidad clínica presente en el autismo, hablando de un espectro, un continuo de dos dimensiones (A y B), proponiendo establecer un baremo de gravedad de los síntomas y de afectación para cada una de las dimensiones, englobando bajo una sola entidad nosológica a un grupo de pacientes con características similares (Tablas 4 y 5).

**Tabla 4.** DSM-5: Criterios Diagnósticos del Trastorno del Espectro Autista

<p><b>Debe cumplir los criterios A, B, C y D:</b></p> <p><b>A. Déficits persistentes en la comunicación y en la interacción social en diversos contextos, no atribuibles a un retraso general del desarrollo, manifestando simultáneamente los tres déficits siguientes:</b></p> <p>1. Déficits en la reciprocidad social y emocional; que pueden abarcar desde un acercamiento social anormal y una incapacidad para mantener la alternancia en una conversación, pasando por la reducción de intereses, emociones y afectos compartidos, hasta la ausencia total de iniciativa en la interacción social</p> <p>2. Déficits en las conductas de comunicación no verbal que se usan en la comunicación social; que pueden abarcar desde una comunicación poco integrada, tanto verbal como no verbal, pasando por anomalías en el contacto visual y en el lenguaje corporal, o déficits en la comprensión y uso de la comunicación no verbal, hasta la falta total de expresiones o gestos faciales</p> <p>3- Déficits en el desarrollo y mantenimiento de relaciones adecuadas al nivel de desarrollo (más allá de las establecidas con los cuidadores); que pueden abarcar desde dificultades para mantener un comportamiento apropiado a los diferentes contextos sociales, pasando por las dificultades para compartir juegos imaginativos, hasta la aparente ausencia de interés en las otras personas</p> <p><b>B. Patrones de comportamiento, intereses o actividades restringidas y repetitivas que se manifiestan al menos en dos de los siguientes puntos:</b></p> <p>4. Habla, movimientos o manipulación de objetos estereotipada o repetitiva (estereotipias motoras simples, ecolalia, manipulación repetitiva de objetos o frases idiosincráticas)</p> <p>5. Excesiva fijación con las rutinas, los patrones ritualizados de conducta verbal y no verbal, o excesiva resistencia al cambio (como rituales motores, insistencia en seguir la misma ruta o tomar la misma comida, preguntas repetitivas o extrema incomodidad motivada por pequeños cambios)</p> <p>6. Intereses altamente restrictivos y fijos de intensidad desmesurada (como una fuerte vinculación o preocupación por objetos inusuales y por intereses excesivamente circunscritos y perseverantes)</p> <p>7. Hiper o hipo reactividad a los estímulos sensoriales o inusual interés en aspectos sensoriales del entorno (como aparente indiferencia al dolor/calor/frío, respuesta adversa a sonidos o texturas específicas, sentido del olfato o del tacto exacerbado, fascinación por las luces o los objetos que ruedan)</p> <p><b>C. Los síntomas han de estar presentes en las primeras fases del período de desarrollo (pero pueden no manifestarse totalmente hasta que la demanda social supera las capacidades limitadas, o pueden estar enmascarados por estrategias aprendidas en fases posteriores de la vida)</b></p> <p><b>D Las alteraciones no se explican mejor por una discapacidad intelectual o por un retraso global del desarrollo</b></p> <p><b>E. Estas alteraciones no se explican mejor por la discapacidad intelectual (trastorno del desarrollo intelectual) o por el retraso global del desarrollo. La discapacidad intelectual y el trastorno del espectro del autismo con frecuencia coinciden; para hacer diagnósticos de comorbilidades de un trastorno del espectro del autismo y discapacidad intelectual, la comunicación social ha de estar por debajo de lo previsto para el nivel general de desarrollo</b></p>
---

**Tabla 5.** DSM-5: Niveles de gravedad para el Trastorno del Espectro Autista

	<b>Comunicación social</b>	<b>Intereses restringidos y conductas repetitivas</b>
<b>Nivel 3: “requiere soporte muy substancial”</b>	Severos déficits en habilidades de comunicación social verbal y no verbal causan severas discapacidades de funcionamiento; muy limitada iniciación de interacciones sociales y mínima respuesta a las aproximaciones sociales de otros	Preocupaciones, rituales fijos y/o conductas repetitivas interfieren marcadamente con el funcionamiento en todas las esferas. Marcado malestar cuando los rituales o rutinas son interrumpidos; resulta muy difícil apartarlo de un interés fijo o retorna a él rápidamente
<b>Nivel 2: “requiere soporte substancial”</b>	Marcados déficits en habilidades de comunicación social verbal y no verbal; aparentes discapacidades sociales incluso recibiendo apoyo; limitada iniciación de interacciones sociales y reducida o anormal respuesta a las aproximaciones sociales de otros	Rituales y conductas repetitivas y/o preocupaciones o intereses fijos aparecen con suficiente frecuencia como para ser obvios al observador casual e interfieren con el funcionamiento en variados contextos. Se evidencia malestar o frustración cuando se interrumpen rituales y conductas repetitivas; dificultad a apartarlo de un interés fijo
<b>Nivel 1: “requiere soporte”</b>	Sin recibir apoyo, déficits en comunicación social causan discapacidades observables. Tiene dificultad al iniciar interacciones sociales y demuestra claros ejemplos de respuestas atípicas o no exitosas a las aproximaciones sociales de otros. Puede aparentar una disminución en el interés a interaccionar socialmente	Rituales y conductas repetitivas causan interferencia significativa con el funcionamiento en uno o más contextos. Resiste intentos de otros para interrumpir rituales y conductas repetitivas o ser apartado de un interés fijo

## 1.2 Epidemiología

Desde principios de los 90 se ha incrementado notablemente la preocupación pública por los aumentos registrados en los estudios de prevalencia del TEA, lo que ha puesto de manifiesto la necesidad de establecer una vigilancia sistemática por parte de los diferentes sistemas sanitarios (Sun et al, 2013). Debido a la falta de marcadores biológicos que permitan un diagnóstico precoz y fiable del TEA, los estudios epidemiológicos han cobrado una notable importancia en el estudio de este trastorno, tratando de contribuir a esclarecer los diferentes factores etiológicos que puedan influir en el desarrollo de la sintomatología autista.

Los primeros trabajos de prevalencia de autismo referían cifras en torno a 4-5/10.000 (Posada-De la Paz et al, 2005). En estudios posteriores las cifras se han incrementado notablemente. Bertrand et al (2001), estimaron por su parte

en Estados Unidos una prevalencia de 30-60/10.000. En España, un estudio realizado en Canarias (ForTEA et al, 2013), estimó una prevalencia de 1/164, coincidiendo la mayoría de estudios en que existe una mayor prevalencia de niños que de niñas, (4-5/1) y que no existe diferencia en cuanto a grupos sociales o razas (Sun et al 2013; Bertrand et al, 2001). En Estados Unidos, el Centro de Control de Enfermedades ha realizado un importante estudio epidemiológico en el TEA a partir de los datos recogidos en el sistema de vigilancia "Autism and Developmental Disabilities Monitoring" (ADDM) en 14 estados (CDC 2012). Los autores estimaron una prevalencia media de 1/88 entre los 14 estados que participaron en el estudio. Separado por sexos, se determinó una prevalencia de 1/54 niños y de 1/252 niñas, con un ratio a favor de los hombres que varió entre el 2.7 y 7.2 en los 14 estados. En cuanto a las diferencias étnicas, la prevalencia entre niños blancos no hispanos fue de 12/1000, significativamente mayor que la de los niños negros y los hispanos (10.2 y 7.9/1000 respectivamente). La alarma ocasionada tras la difusión de este estudio animó a Taylor et al, a realizar un estudio epidemiológico entre 2004 y 2008 en niños de 8 años a partir de los datos registrados por médicos del Reino Unido y registrados en la base de datos "General Practice Research Database" (GPRD). Los autores determinaron una prevalencia en torno a 4/1000 niños en 2008, cifra que pese a suponer un notable aumento respecto a estudios anteriores, es significativamente inferior a los 11/1000 registrados en Estados Unidos. Sin embargo, la diferencia puede deberse en parte a que el estudio estadounidense se basa en un sistema de estimación de prevalencia a partir de la presencia de sintomatología autista recogida por diferentes profesionales en el ADDM, mientras que el estudio británico contabiliza solo casos confirmados. De cualquier modo, parece existir un importante aumento de la prevalencia del TEA, la cual puede deberse a un verdadero aumento de la incidencia o a otros factores como la mejora de los sistemas de diagnóstico y de detección precoz, o modificaciones de los criterios diagnósticos.

### **1.3 Clasificación del Trastorno del Espectro Autista**

#### ***Trastorno del Espectro Autista Primario***

Por lo general, cuando hablamos de autismo, nos referimos al autismo primario, aquel que no se asocia a otro síndrome o enfermedad con manifestaciones propias y distintas al TEA. Como hemos comentado anteriormente, en este grupo se encuentran la mayoría de pacientes diagnosticados de TEA, y al igual que en los casos sindrómicos, parecen influir numerosos factores etiológicos en el desarrollo de la sintomatología autista. Recordemos que en su origen, el autismo era considerado como un desorden psicológico próximo a la esquizofrenia infantil, originado por una crianza anómala por parte de unos padres distantes, incapaces de dar al niño los cuidados y cariño que necesita. La visión actual del TEA primario es la de un desorden neurobiológico que parece responder a un modelo de multicausalidad. Sin embargo, gran parte de los hallazgos no han sido constantes en los diferentes estudios realizados, por lo que a menudo hablamos de "hipótesis" o "teorías" etiopatogénicas, de las cuales desarrollaremos las que incumben a este trabajo, en el apartado 1.4.

#### ***Trastorno del Espectro Autista Secundario***

Tradicionalmente el TEA se ha clasificado en primario o idiopático y secundario o sindrómico. Este último es aquel que se asocia a otro síndrome o alteración que puede ocasionar sintomatología autista, pero que no está definido por la misma. De hecho en muchos casos, se cataloga a los pacientes con el diagnóstico del síndrome asociado, obviando el de TEA. Pese a que la mayoría de estudios cifran la proporción de casos secundarios en torno al 10%, es obligado descartar en el proceso diagnóstico las asociaciones más frecuentemente asociadas al TEA (Artigas-Pallarés et al, 2005), de las cuales revisaremos algunas de las más frecuentes. Hasta el momento se han identificado numerosos síndromes asociados al TEA, en los cuales el autismo es considerado como secundario, pudiendo presentarse clínicamente como el autismo primario o como formas incompletas (Tabla 6). Pese a que el presente

trabajo se basa principalmente en el TEA primario, revisaremos tan solo las principales asociaciones de síndromes de base genética asociados a autismo.

**Tabla 6.** TEA sindrómico de base genética

- Deleciones y duplicaciones 15q11-13	- Enfermedad de Duchenne
Síndrome de Prader-Willi	- Síndrome de Timothy
Síndrome de Angelman	- Delección terminal 10p
Inversión-duplicación 15q11-13	- Síndrome de Cowden
- Síndrome del X-frágil	- Mosaicismos 45,X/46,XY
- Síndrome de Williams	- Síndrome de Myhre
- Síndrome de Ret	- Síndrome de Sotos
- Delección 2q37.3	- Síndrome de Cohen
- Síndrome XYY	- Síndrome de Goldenhar
- Síndrome de Smith-Lemli-Opitz	- Síndrome de Joubert
-Síndrome de Apert	- Síndrome deLujan-Fryns
- Mutaciones del Gen ARX	- Síndrome de Moebius
- Síndrome de Lange	- Hipomelanososis de Ito
- Síndrome de Smith-Magenis	- Neurofibromatosis I
- Síndrome de Noonan	- Síndrome CHARGE
- Síndrome de Down	- Síndrome HEADD
- Síndrome Velocardiofacial	
- Distrofia Miotónica de Steinert	
- Complejo esclerosis tuberosa	

Tomado de Artigas-Pallarés J et al (2006)

El síndrome del X frágil (SXF) es posiblemente la causa hereditaria más común de retraso mental, presentando una prevalencia aproximada de 1/5160 varones (Zafeiriou et al, 2013; Coffee et al, 2009). Presenta una herencia ligada al X, afectando fundamentalmente a varones. Se debe a una mutación en el gen FMR1 y el consiguiente déficit de su producto, la proteína FMRP, causado por una expansión del triplete de nucleótidos CGG, la cual se encuentra en la región no traducida 5' del gen. El SXF se produce a partir de 200 repeticiones del triplete, mientras que la presencia de 55 a 199 se considera estado de portador o premutación, pudiendo originar cuadros incompletos o más leves del SXF. Los sujetos afectados del SXF presentan discapacidad intelectual y un fenotipo conductual que asocia hiperactividad, impulsividad, disminución del contacto ocular, timidez y estereotipias. Físicamente presentan un fenotipo característico no siempre evidente, que consiste en cara alargada, frente y orejas prominentes, macroorquidismo postpuberal y estatura alta (Berry-Kravis et al, 2010). Al nacimiento pueden presentar peso elevado y fontanela anterior de gran tamaño (Terracciano et al, 2005). Los últimos estudios epidemiológicos estiman una prevalencia de TEA en sujetos con SXF entre el 25-50%



dependiendo de los criterios y métodos utilizados (Clifford et al, 2007; García-Nonell et al, 2008; Hall et al, 2008). A la inversa, el SXF se diagnostica en el 0-3% de los pacientes con TEA (Kosinavsky et al, 2005; Reddy 2005; McInnes et al, 2005). En lo que refiere a la sintomatología autista, los pacientes con SXF presentan diferencias cualitativas en diversos aspectos respecto al TEA idiopático. Suelen presentar gran ansiedad social, timidez extrema, hiperexcitación, mientras que las habilidades de la interacción social recíproca y de comunicación están menos limitadas que en el TEA idiopático (Hall et al, 2010), mostrando una aparente sensibilidad emocional conservada y voluntad de interactuar (Roberts et al, 2007), presentando por lo general un fenotipo de TEA menos severo que los casos idiopáticos.

La región 15q11-q13 está cobrando gran interés en los estudio genéticos del TEA. Existe una estrecha relación entre esta región y el desarrollo de TEA tanto secundario como primario. La presencia de un cromosoma 15 isodicéntrico da lugar a un síndrome que se caracteriza por diversos grados de deficiencia intelectual, discurso pobre, hipotonía, rasgos dismórficos, epilepsia y autismo (Battaglia et al, 2010) hasta un 92-95% de los casos (Hogart et al, 2010). Sin embargo, pese a presentar rasgos claros de TEA, algunas conductas como la evolución de la interacción social o la adquisición de habilidades comunicativas a lo largo del tiempo llevaron a Battaglia et al a sugerir que los individuos con cromosoma 15 isodicéntrico no son "verdaderos autistas" pese a la presencia de numerosas conductas autistas.

El Síndrome de Prader-Willi (SPW) se origina como consecuencia de la falta de expresión de la región 15q11-q13 de origen paterno por disomía uniparental, mutación del gen materno o impronta genética, aunque no se puede excluir la implicación de otros genes (Buiting, 2010). El SPW se caracteriza por retraso mental, hipogonadismo, obesidad y alteraciones conductuales características como rasgos obsesivo-compulsivos, conducta centrada en la obtención de comida, conducta manipuladora y reiterativa. El TEA alcanza una tasa de prevalencia del 19-36.5% (Descheemaeker et al, 2006). El Síndrome de Angelman (SA) tiene una gran similitud genética con el SPW pero manifestaciones completamente diferentes. Se origina por la falta de expresión del gen UBE3A de origen materno en la región 15q11-q13, por los

mismos mecanismos citados anteriormente o bien por la mutación puntual del UBE3A, aunque para el desarrollo de TEA en este caso pueden contribuir la participación de otros genes (Bonati et al, 2007). El gen UBE3A materno codifica la E AP-3A ubiquitin protein lipasa, importante en la degradación de sustratos proteicos en las neuronas, que se ha asociado además de con el SA, con casos de autismo familiar. Los pacientes afectados del SA presentan un evidente retraso en el desarrollo de forma precoz (Buiting, 2010), retraso en la adquisición del lenguaje, risas inmotivadas y convulsiones. Suele acompañarse de hipotonía de tronco con hipertrofia de extremidades, falta de equilibrio y tendencia a aumentar la base de sustentación. Suelen ser hiperactivos, excitables y es frecuente el aleteo de manos y problemas en las relaciones sociales. Sin embargo a menudo es difícil identificar el TEA en estos pacientes por su profunda discapacidad, aunque está presente entre el 50-61% de los casos de SA (Bonati et al, 2007; Sahoo et al, 2006).

Se han hallado duplicaciones proximales 15q en personas con TEA y diversos grados de retraso mental. En un estudio en el que una madre era portadora de una duplicación 15q11-13, dos hijos autistas habían heredado la duplicación mientras un tercer hijo no afecto, no había heredado la duplicación materna. La duplicación de la madre procedía "de novo" del cromosoma 15 paterno. Este ejemplo pone en evidencia la importancia del origen materno o paterno de la duplicación, y una posible explicación pudiera ser el fenómeno de la impronta genética (Artigas-Pallarés et al, 2005). Además de la relación del TEA y síndromes 15q11-q13 existe una relación a la inversa. La presencia de alteraciones en esta región se encuentran en aproximadamente el 1% de los casos de TEA catalogados como primarios. Depienne et al (2009), sugieren que los pacientes con TEA deben ser examinados de forma sistemática las regiones descritas, especialmente cuando se asocia a retraso mental.

El Síndrome de Rett es un cuadro severo del desarrollo del sistema nervioso que afecta solo a mujeres, y que se engloba dentro de los Trastornos Generalizado del Desarrollo del DSM-4. Se produce por una mutación en el gen MeCP2 del cromosoma X. Se caracteriza por un desarrollo aparentemente normal los primeros 6 a 18 meses, seguida de una regresión rápida de distintas habilidades motoras, lingüísticas, apareciendo alteraciones motoras,

estereotipias, falta de interacción social, y desarrollo de microcefalia (Artigas-Pallarés et al, 2005) (Tabla 7).

**Tabla 7.** DSM 5 Criterios Diagnósticos del Síndrome de Rett

<b>A. Todas las características siguientes:</b>
1. Desarrollo prenatal y perinatal aparentemente normal
2. Desarrollo psicomotor aparentemente normal durante los primeros 5 meses después del nacimiento
3. Circunferencia craneal normal en el nacimiento
<b>B. Aparición de todas las características siguientes después del período de desarrollo normal:</b>
1. Desaceleración del crecimiento craneal entre los 5 y 48 meses de edad
2. Pérdida de habilidades manuales intencionales previamente adquiridas entre los 5 y 30 meses de edad, con el subsiguiente desarrollo de movimientos manuales estereotipados (p. ej., escribir o lavarse las manos)
3. Pérdida de implicación social en el inicio del trastorno (aunque con frecuencia la interacción social se desarrolla posteriormente)
4. Mala coordinación de la marcha o de los movimientos del tronco
5. Desarrollo del lenguaje expresivo y receptivo gravemente afectado, con retraso psicomotor grave

## 1.4 Etiopatogenia en el Trastorno del Espectro Autista primario

### 1.4.1 Inflamación

La inflamación es la respuesta originada por el sistema inmune ante una agresión ocasionada por un microorganismo o sus productos, o por cualquier otro agente biológico, mecánico, físico o químico capaz de generar una lesión tisular. Es por tanto, un mecanismo de defensa innato e inespecífico, que se origina como respuesta reparadora ante una injuria, pese a que pueda ocasionar por si misma una lesión tisular como veremos a continuación. En la inflamación intervienen diversos tipos celulares y un amplio grupo de mediadores e inductores proinflamatorios (Tabla 8).

**Tabla 8.** Principales citoquinas implicadas en el autismo primario

<b>CITOQUINAS</b>	<b>ORIGEN</b>	<b>FUNCIÓN</b>
IL-1 $\alpha$ IL-1 $\beta$	Monocitos-Macrófagos	Fiebre (pirógeno endógeno), sueño, anorexia, inflamación, expresión de CD 54 en las células endoteliales y liberación del factor tisular, activación linfocitaria, producción de IL-6 Y CSF
IL-2	Células T	Induce la proliferación de la célula T, coestimula la proliferación y diferenciación de la célula B
IL-3	Células T, mastocitos	Potencia a las células NK y LAK
IL-4	Células T, mastocitos	Induce la proliferación del mastocito, proliferación de la célula hematopoyética pluripotencial
IL-5	Células T, mastocitos	Induce la proliferación de la célula T y la generación de LTC, coestimula la proliferación de la célula B, sinergiza con la IL-3 en la proliferación del mastocito, estimula la producción de Ig E e Ig G 4, induce la expresión y liberación de CD 23, la clase II del CMH en la células B, cambia de TH a TH2.
IL-6	Monocitos, fibroblastos	Induce la diferenciación de eosinófilos y la producción de Ig A
IL-7	Células de la médula ósea y del estroma tímico	Pirogénica, induce la proliferación de plasmocitomas e hibridomas, aumenta la producción de Ig, la clase I en los fibroblastos, acción con la IL-2 en la producción de Proteínas de Fase Aguda por lo hepatocitos, acción sinérgica con la IL-3 en la producción de la célula hematopoyética, induce la diferenciación del LTC. Induce la proliferación de las células pro y pre B de los linfocitos inmaduros
IL-8 (quimiocina)	Monocitos, células endoteliales, macrófagos alveolares, fibroblastos.	Induce la quimiotaxis y activación de neutrófilos y células T
IL-10	Células T	Induce la proliferación de algunas células T, potencia la proliferación del mastocito inducida por la IL-3
IL-11	Células T, células B activadas y monocitos.	Inhibe la activación del MAC, estimula la producción de célula B y la producción de Ac, estimula los mastocitos y cambia de TH a TH2
IL-12	Células del microambiente hematopoyético	Estimula la producción de Ac, acción sinérgica con la IL-3 en la producción de megacariocitos, estimula los progenitores del macrófago
IL-13	Monocitos, macrófagos, algunas células B y mastocitos.	Activa a las NK para secretar IFN- $\gamma$ , cambia TH a TH1, inhibe la producción de Ig E inducida por la IL-4

IL-14	Células T	Induce la proliferación y diferenciación de células B e inhibe la producción de IL-1
IL-15	Células B y macrófagos	Induce la secreción de Ig E
IL-16	Células T	Induce la proliferación de la célula B
IL-17	Células no linfoides, musculares	Induce la proliferación y citotoxicidad de las células NK
IL-18	Células endoteliales y monocitos	Inmunomoduladora

(Peña, <http://Inmunologiaenlinea.es>)

Tabla 9. Interferones relacionados con el autismo

INTERFERON	ORIGEN	FUNCIÓN
IFN- $\alpha$	Linfocitos	Coestimula la producción de la célula T, induce la secreción de la IL-6, IL-8 y G-CSF a partir de las células endoteliales, epiteliales y fibroblástica
IFN- $\beta$	Fibroblastos y células amnióticas	Incrementa la expresión de antígenos de clase I y II HLA. Y la actividad de células NK. Induce el factor Inductor del IFN- $\gamma$ similar a la IL-1
IFN- $\gamma$	Linfocitos CD 4+ y CD 8+, células NK y Th 1	Posee efectos antivirales e inmunomodulatorios. Es quimiotáctico para monocitos y aumenta en ellos la expresión de HLA clase I

(Peña, <http://Inmunologiaenlinea.es>)

Tabla 10. Factores de Necrosis Tumoral relacionados con el autismo primario

TNF	ORIGEN	FUNCIÓN
TNF- $\alpha$	Fibroblastos, células NK, neutrófilos, astrositos, células endoteliales y células del músculo liso	Proinflamatorio, antitumoral. Agente neovascularizante y estimulante de la resorción ósea
TNF- $\beta$	Linfocitos	Similar al anterior

(Peña, <http://Inmunologiaenlinea.es>)

### ***Inflamación y enfermedades neurológicas***

En los últimos años la inflamación está cobrando gran interés en los estudios etiopatogénicos de las enfermedades mentales, como en el caso de la depresión mayor. En comparación con individuos sanos, los sujetos con depresión mayor presentan todas las características cardinales de la inflamación (Miller et al, 2009), incluyendo elevaciones de citoquinas inflamatorias y sus receptores solubles en sangre y líquido cefalorraquídeo (LCR), así como elevaciones en sangre de los niveles de proteínas de fase aguda, moléculas de adhesión y mediadores inflamatorios como las prostaglandinas (Raison et al, 2006). La asociación entre los marcadores inflamatorios y algunos de los síntomas depresivos (Meyers et al, 2005; Motivala et al, 2005) como la fatiga, disfunción cognitiva y alteraciones del sueño se han relacionado con los niveles elevados de IL-6 y con el aumento de actividad del factor nuclear kappa B (NF-KB) (Irwin et al, 2008; Reichenberg et al, 2001). Por otro lado, existen varias líneas de evidencia que indican que la administración de citoquinas o inductores de citoquinas como liposacáridos o la vacunación en sujetos sanos pueden causar síntomas relacionados con la depresión como fatiga, confusión, angustia o tristeza (Brydon et al, 2008; Mendlewicz et al, 2006). Por último, algunos estudios han mostrado mejoría de la respuesta al tratamiento con antidepresivos al añadir un inhibidor de la ciclooxigenasa como la aspirina (Mendlewicz et al, 2006) o el celecoxib (Muller et al, 2006).

La inflamación y la disfunción inmunológica pueden tener un papel en la etiología de los trastornos psicóticos (Suvisaari et al, 2013). Hay evidencias de un aumento de la actividad inflamatoria del sistema inmune tanto innato como adaptativo en la esquizofrenia y en el trastorno bipolar (Drexhage et al, 2010). Se han detectado elevaciones en suero y LCR de citoquinas inflamatorias y otros mediadores inflamatorios, así como el aumento de expresión de genes relacionados con la actividad inflamatoria de los monocitos (Drexhage et al, 2010; Padmos et al 2008; Drexhage et al, 2011; Suvisaari et al, 2013). Existe evidencia de que la actividad inflamatoria o inmunológica en la etapa prenatal aumenta el riesgo de desarrollar esquizofrenia y otros trastornos psicóticos (Miller et al, 2013).

Las citoquinas participan activamente en el desarrollo y función del

sistema nervioso central (SNC), lo que puede explicar la relación de las enfermedades mentales y la actividad inflamatoria. Se ha demostrado que las citoquinas son especialmente importantes para el desarrollo neuronal y su función (Deverman et al, 2009; Carpentier et al, 2009). Durante el desarrollo fetal contribuyen a la regulación de la neurogénesis, gliogénesis, a la migración de progenitores, a la proliferación axonal y al desarrollo de la microglía (Deverman et al, 2009; Boulanger, 2009). Participan en la regulación de la supervivencia neuronal, la modulación de sinapsis, la renovación de células madre neuronales, la diferenciación celular y la reparación cerebral (Deverman et al, 2009; Bauer et al, 2009; de Araujo et al, 2009). Un papel importante de las citoquinas es su participación en la plasticidad neuronal, que incluye el desarrollo y estabilización de sinapsis, fenómeno importante en funciones mentales superiores como la memoria, o en mantener en equilibrio circuitos de excitación e inhibición (Boulanger, 2009). La neurogénesis en el hipocampo, en la cual participan las citoquinas, es de gran interés en los trastornos psiquiátricos debido a que las nuevas neuronas ejercen funciones críticas en el hipocampo como la participación en procesos de aprendizaje y la memoria (Kempermann, 2011).

### ***Inflamación y Trastorno del Espectro Autista***

En los últimos años se han desarrollado diferentes trabajos que apoyan la teoría de que en un grupo de pacientes autistas existe un componente inflamatorio, y que esta situación proinflamatoria podría contribuir en la fisiopatología del TEA (Rodriguez et al, 2011). Pardo et al (2005), Vargas et al (2005), y Morgan et al (2010), encontraron un aumento de citoquinas proinflamatorias en el cerebro y LCR de niños con TEA. Los autores encontraron un patrón inflamatorio activo en la corteza cerebral, sustancia blanca y particularmente en cerebelo. Los autores señalaron que la activación microglial hallada puede jugar un papel fundamental en la patogénesis del cerebro autista. Encontraron significativamente más microglía en la corteza fronto insular y visual que los controles.

Ahlsen et al (1993), determinaron los niveles de la Proteína Ácida Glial Cerebral (GFAP) en LCR de niños autistas, encontrando un nivel promedio tres veces superior al del grupo control. Los autores determinaron que esta

situación podría indicar gliosis y daño cerebral. Por su parte, Laurence et al (2005), cuantificaron los niveles de GFAP en muestras de tejido cerebral post mortem de pacientes con autismo, encontrando niveles superiores a las muestras de control en la corteza frontal, parietal y en cerebelo, concluyendo que la elevación de la GFAP podría confirmar la activación microglial y astrogial en el autismo, e indicaría gliosis, lesión reactiva y perturbación de los procesos de migración neuronal. Fatemi et al (2008), hallaron un incremento significativo en pacientes autistas de los marcadores de astrocitos acuoporina 4 y conexina 43 en áreas como el cerebelo, el área 40 de Brodmann y la corteza frontal superior, lo que indicaría activación de astrocitos.

Parecen existir evidencias de un incremento de citoquinas inflamatorias en el cerebro y LCR de niños autistas. Li et al (2009), afirmó que los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, GM-CSF e IFN- $\gamma$  eran significativamente superiores en los cerebros de pacientes con TEA que en controles. Vargas et al (2005), hallaron niveles significativamente superior del TGF- $\beta$ 1 de origen neuroglial en la circunvolución frontal media respecto a controles. También encontraron niveles superiores de la Proteína Quimiotáctica de Macrófagos (MCP-1), IL-6, IL-8, e IFN- $\alpha$  en la circunvolución cingular anterior, y de MPC-1, IL-6, IL-8 e IFN- $\alpha$  en LCR. Chez et al (2007), también demostraron un aumento significativo de los niveles de TNF- $\alpha$  en LCR de pacientes autistas respecto a controles.

Molloy et al (2006), realizaron un estudio de casos y controles en el que hallaron que las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la muestra de niños autistas producen niveles significativamente más altos de las citoquinas Th2 IL-2, IL4, IL-5 e IL-13. También existió una tendencia hacia niveles superiores de IL-2 y la interleuquina Th1 IFN- $\gamma$ . Esta diferencia entre casos y controles no persistió después de la estimulación mitógena de las PBMC. Los autores sugieren que este aumento de las citoquinas sin estimulación puede indicar una respuesta inmune alterada, con una repuesta predominante, aunque no exclusiva de células Th2. El aumento de cualquiera de las citoquinas Th1 o Th2 debe producir un aumento compensatorio de la IL-10 con efecto inmunomodulador (Moore et al, 2001), sin embargo los autores refieren una ausencia de aumento compensatorio de la IL-10 en los pacientes autistas. Además hallaron un mayor número de eosinófilos en sangre periférica en los casos respecto a los controles. Finalmente, los autores valoraron como



limitación del estudio la no exclusión de niños con tratamiento farmacológico. Sin embargo, tras una revisión de la literatura (Bastererzi et al, 2005; Zhang et al, 2004) concluyeron que es poco probable que los fármacos fueran responsables de las diferencias encontradas.

Angelidou et al (2012), realizaron una interesante revisión sobre inflamación cerebral y estrés perinatal asociado al TEA. Los autores plantean la posibilidad de la existencia de un endofenotipo de autismo con disregulación autoinmune, tal y como han referido diversos autores (Mostafa et al, 2009; Enstrom et al, 2009; Wills et al, 2007), y que ésta podría participar en la patogenia de los síntomas autistas en estos pacientes. En una cohorte de niños autistas egipcios, el 54.5% presentaron anticuerpo antineurona (Mostafa et al, 2010), lo que puede indicar una pérdida de la auto tolerancia a los antígenos neuronales durante las primeras fases del neurodesarrollo, aunque por el momento se desconoce su papel exacto en la patogenia de la sintomatología autista. Por otro lado, los autores valoraron la importancia del papel del TGF- $\beta$ 1 en el TEA. Hay autores que han detectado niveles bajos del TGF- $\beta$ 1 en niños TEA (Ashwood et al, 2008), aunque la importancia de este hallazgo no está claro basándonos en estudios animales, ya que una sobreexpresión de TGF- $\beta$ 1 después del nacimiento, podría relacionarse con disminución de la interacción social en ratones, mientras una sobreexpresión crónica de TGF- $\beta$ 1 en ratones adultos condiciona un comportamiento opuesto, lo que podría estar en consonancia con la sobreexpresión de TGF-beta1 hallada en pacientes autistas (Depino et al, 2011).

La expresión de NF-KB podría participar en la neuroinflamación de algunos pacientes con TEA. Young et al (2011), afirmaron que NF-KB se expresa de forma aberrante en la corteza orbitofrontal en pacientes con TEA, lo cual podría formar parte de una cascada molecular inflamatoria que tendría lugar fundamentalmente en regiones del cerebro implicadas en la sintomatología autista. Naik et al (2011), examinaron las muestras de sangre periférica de 67 niños autistas y 29 niños controles, y determinaron que el grupo de autistas presentó un aumento de la actividad de NF-KB estadísticamente significativa respecto al grupo de control.

### **1.4.2 Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo es aquella situación caracterizada por un desequilibrio entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la disponibilidad o acción de los mecanismos antioxidantes compensatorios. El estrés oxidativo puede causar muerte celular o desencadenar la apoptosis, o incluso cuando es muy intenso puede originar necrosis. Como norma general, las células mantienen en su interior un estado reducido gracias a la acción de enzimas reductoras. Cuando se produce un desbalance en este estado redox, predomina la producción de peróxidos y radicales libres que dañan los componentes celulares como las proteínas, lípidos y el DNA. Un aspecto particularmente destructivo del estrés oxidativo es la producción de ERO, que incluyen los radicales libres y los peróxidos. La mayoría de estas especies derivadas del oxígeno se producen en un nivel bajo en condiciones normales de metabolismo aeróbico y el daño que causan a las células es reparado constantemente. Sin embargo, bajo los graves niveles de estrés oxidativo que causa la necrosis, el daño produce agotamiento de adenosín trifosfato (ATP) impidiendo la muerte celular por apoptosis controlada. La fuente más importante de oxígeno reactivo en condiciones normales en organismos aeróbicos es probablemente la pérdida de oxígeno activado de las mitocondrias durante el funcionamiento normal de la respiración oxidativa.

Ante el peligro que representa el daño oxidativo, las células se encuentran habilitadas con mecanismos de protección: preventivos, secuestradores y reparadores de este deterioro. Los antioxidantes celulares mejor estudiados son las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GSH-Px). Antioxidantes enzimáticos menos estudiados (pero probablemente muy importantes) son la peroxirredoxina y la sulfirredoxina. Otras enzimas que tienen propiedades antioxidantes (aunque ésta no es su función primordial) incluyen la paraoxonasa, la glutatión S-transferasa, y la aldehído deshidrogenasa. La medición del estrés oxidativo puede realizarse a través de los siguientes parámetros:

- Concentración de GSH-Px: se realiza basándose en el consumo de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) a 340nm, coenzima involucrada en la reacción catalizada por la glutatión reductasa (GSSGR).
- Concentración de glutatión (GSH): el glutatión es un tripéptido que contiene

un enlace peptídico inusual entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato. El glutatión es un antioxidante que ayuda a proteger las células de especies reactivas de oxígeno. El glutatión reduce cualquier enlace disulfuro (-S-S-) formado dentro de proteínas citoplasmáticas de cisteínas, al actuar como un donante de electrones. En el proceso, el glutatión se convierte en su forma oxidada disulfuro de glutatión (GSSG). El glutatión se encuentra casi exclusivamente en su forma reducida, ya que la enzima que cataliza la reducción, la glutatión reductasa (GR), es constitutivamente activa e inducible por estrés oxidativo. De hecho, la proporción de glutatión reducido a glutatión oxidado dentro de las células a menudo se utiliza científicamente como una medida de la toxicidad celular.

- Lipoperoxidación en tejidos animales: los radicales libres atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y lipoproteínas transformándolos en ácidos grasos peroxidados, los cuales sufren un acortamiento de su cadena lateral liberando malondialdehído (MDA), de tal manera que la concentración sérica de MDA, es proporcional a los ácidos grasos poliinsaturados oxidados y por lo tanto un buen indicador de peroxidación lipídica.

### ***Estrés oxidativo y enfermedades neurológicas***

El cerebro consume gran cantidad de oxígeno para desarrollar sus funciones fisiológicas, lo que origina gran cantidad de radicales libres. Algunos factores hacen que el SNC sea susceptible al ataque de las ERO, como el déficit de mecanismos antioxidantes, la alta composición en ácidos grasos poliinsaturados y la selectividad de la barrera hematoencefálica (BHE), que reduce la difusión de algunos antioxidantes como la vitamina E (Diaz-Hung et al, 2013). El estrés oxidativo ha sido estudiado fundamentalmente en las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Lovell et al, 2007), la enfermedad de Parkinson (Nikam et al, 2009; Zhou et al, 2008) y la esclerosis lateral amiotrófica (Chi et al, 2007). En estas enfermedades se ha encontrado daño oxidativo incluso en etapas tempranas de la enfermedad, lo que podría indicar que los radicales libres están relacionados con la etiología de estos procesos. En la enfermedad de Alzheimer se afectan específicamente las neuronas piramidales del hipocampo y la corteza parietal, y la sustancia

negra compacta, las neuronas del estriado y las motoneuronas en la enfermedad de Parkinson, Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica, respectivamente. Desafortunadamente, los mecanismos que determinan la vulnerabilidad neuronal selectiva actualmente son desconocidos (Mattson et al, 2006).

### ***Estrés oxidativo y Trastorno del Espectro Autista***

Recientemente se está consolidando la teoría de que el estrés oxidativo podría intervenir en la patogenia del TEA (Kern et al, 2013; Essa et al, 2012). Varios estudios (López-Hurtado et al, 2008; Evans et al, 2008; Sajdel-Sulkowska et al, 2008, 2009 y 2011; Chauhan et al, 2011 y 2012) de tejido cerebral postmortem revelaron que en personas diagnosticadas de TEA se detectó un estado de estrés oxidativo. Un ejemplo de ello lo encontramos en el estudio de López-Hurtado et al (2008), en el que los autores informaron que la densidad de la lipofusina, un material de depósito que se forma como consecuencia de la oxidación en los tejidos, era mayor en las áreas cerebrales corticales en relación con la comunicación en pacientes con TEA que en los controles, lo cual puede estar en relación al déficit de la capacidad comunicativa y del lenguaje relacionada con el autismo. Sajdel-Sulkowska et al (2011), informaron que existe unos niveles más altos en pacientes autistas de los marcadores de estrés oxidativo 3-nitrotirosina en la corteza orbitofrontal, el área de Wernicke, vermis cerebeloso, hemisferios cerebelosos y puente del encéfalo, áreas del cerebro asociadas con el lenguaje, el procesamiento sensorial, la coordinación motora, la emoción, la interacción social y la memoria. En otros estudios, Sajdel-Sulkowska et al (2008 y 2009), encontraron niveles más elevados de los marcadores de estrés oxidativo 3-nitrotirosina y neurotrofina-3 en el cerebelo de pacientes diagnosticados de TEA que en el grupo de control. Evans et al (2008), encontraron elevados los niveles de carboxietil pirrol e iso 4 levuglandín proteín adducts, metabolitos que indican estrés oxidativo en tejido cortical cerebral de personas con TEA en comparación con los controles. Chauhan et al (2012) estudiaron tejidos cerebrales postmortem del cerebelo, y de los lóbulos frontales, temporales y parietales, así como de la corteza occipital de pacientes diagnosticados de TEA y de controles de la misma edad con un desarrollo neurológico normal. Determinaron que la oxidación del DNA se incrementó

significativamente en el grupo de pacientes TEA. Por otra parte, los niveles de glutatión reducido fueron significativamente menores en la corteza frontal, temporal y cerebelo, mientras que los niveles de glutatión oxidado fueron significativamente superiores en la corteza temporal y cerebelo del grupo de individuos con TEA. Chauhan et al (2011), hallaron niveles de peróxidos de lípidos significativamente mayores en la corteza temporal y cerebelo de individuos diagnosticados de TEA en comparación con los controles.

En una cohorte saudí de niños autistas (Al Gadani et al, 2009), los investigadores concluyeron que los niveles plasmáticos de MDA eran significativamente mayores en el plasma de niños autistas que en el grupo de control, el cual podría deberse al aumento de la producción de ERO. Como hemos comentado anteriormente, el MDA procede de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales están presentes en las membranas celulares, por lo que podrían ser indicativos de lesión celular. En este sentido Zoroglu et al (2004), informaron de un aumento de los niveles de TBARS (productos reactivos del ácido tiobarbitúrico) en el suero de pacientes autistas respecto al grupo control, lo que indicaría un aumento de la peroxidación lipídica. Por otra parte Ming et al (2005), refirieron un aumento de la excrección urinaria de 8-isoprostano-alfa en niños autistas respecto a controles, que indicaría un estado de estrés oxidativo. El aumento reportado de peroxidación lipídica en niños autistas, podría ser correlacionado con la disfunción mitocondrial como indican otros autores (Napoli et al, 2013). Sen et al (2007), demostraron que la pérdida del potencial de membrana a nivel mitocondrial y el deterioro en la actividad en la cadena de transporte de electrones pueden ser secundarios a la peroxidación de lípidos de membrana. En base a esta información, los autores plantean la posibilidad de que el estrés oxidativo registrado podría ser correlacionado con el insulto neuronal en el autismo. Kern et al (2006), plantean la hipótesis de que la pérdida de células de Purkinje y el aumento del volumen cerebral en el autismo están relacionados con la toxicidad y aumento de la peroxidación lipídica. Además, el elevado nivel de peroxidación lipídica se correlaciona directamente con la reactividad plaquetaria anormal y el flujo sanguíneo alterado en niños TEA (Yao et al, 2001).

Diversos estudios (Al Gadani et al, 2009; Geier et al, 2008; Vojdani et al,

2008) han mostrado un descenso de los niveles de GSH y de la relación GSH/GSSG en pacientes con TEA, lo que podría indicar un estado de estrés oxidativo. La GSH-Px, es una enzima inducible por estrés oxidativo que proporciona un mecanismo eficaz de defensa celular, ya que elimina peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y peróxidos de lípidos (Al Gadani et al, 2009). Sogout et al (2003), observaron un aumento de la GSH-Px en eritrocitos de pacientes con TEA en comparación con controles, lo cual está en consonancia con los resultados hallados en la cohorte de niños TEA saudís, aunque Yorbik et al (2002), informaron de la presencia de niveles significativamente más bajos de esta enzima en niños TEA. Por otro lado, también se ha reportado un aumento de la actividad de la catalasa en niños TEA (Al Gadani et al, 2009), enzima que protege a las células de la acumulación de  $H_2O_2$ , de la cual, las mitocondrias son la principal fuente de producción. Concluyen los autores, que el aumento de la actividad de la GSH-Px junto con el aumento de la actividad de la catalasa podrían apoyar la teoría de disfunción mitocondrial observada previamente en niños TEA.

La vitamina E es el antioxidante liposoluble más importante. Protege las membranas celulares de la oxidación por acción de radicales libres y se ha sugerido que la función más importante de la vitamina E es la protección del daño neuronal (Zingg et al, 2004). Hay estudios que han reportado niveles significativamente menores de vitamina E en pacientes TEA (Al Gadani et al, 2009) y dado que el cerebro tiene un alto contenido de material lipídico, susceptible de ser protegido de la oxidación por la vitamina E, se ha propuesto su utilización en el tratamiento del autismo y de otras enfermedades neurodegenerativas (Kontush et al, 2004). El ácido ascórbico o vitamina C es un antioxidante hidrosoluble que protege al organismo de la acción de radicales libres (Padayatty et al, 2003). Algunos autores (Gupta et al, 1998; Adamas et al, 2004), han reportado que los niños autistas tenían niveles de vitamina C muy por debajo de los controles de niños sanos. Sin embargo estos hallazgos no han sido constantes en otros estudios (Al Gadani et al, 2009).

#### **1.4.3 Perfil metabolómico**

Unos de los principales problemas asociados a la investigación en el TEA es la gran variedad de fenotipos englobados bajo un mismo término, que a pesar de

que comparten las mismas dificultades, no puede descartarse que se traten de patologías diferentes con distintos mecanismos fisiopatológicos. En este sentido, nuevas técnicas como el estudio del perfil metabolómico pueden contribuir a esclarecer el origen de los diferentes fenotipos del TEA a través de su potencial para realizar el análisis global de metabolitos de bajo peso molecular, lo que podría correlacionarse con alteraciones sistémicas.

Yap et al (2010), informaron una alteración en la vía metabólica del triptófano-ácido nicotínico utilizando una plataforma basada en resonancia magnética nuclear en orina de niños autistas. Otros autores hallaron alteraciones del metabolismo de los aminoácidos, carbohidratos y de las vías del estrés oxidativo en muestras de orina mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC – MS) (Bitar et al, 2018; Mavel et al, 2013; Ming et al, 2012) y resonancia magnética nuclear (Noto et al, 2014) en pacientes TEA. En general, el TEA se ha asociado a alteraciones en los metabolomas de muestras de plasma y orina relacionadas con las vías metabólicas del triptófano, ácido nicotínico, purinas, vitamina B6 y el aumento del estrés oxidativo, así como alteraciones de la microbiota intestinal (Gevi et al, 2016; Lussu et al, 2017; Mavel et al, 2013; Mussap et al. 2016; Nadal-Desbarats et al, 2014).

Recientemente, West et al (2014) han descrito alteraciones en las rutas metabólicas del aspartato, citrato, creatinina, DHEA-S, isoleucina, glutamato y glutarato en plasma, que no habían sido descritas anteriormente en orina. Por tanto, el análisis metabólico en plasma parece ser una herramienta adecuada para una profundizar en la investigación de los mecanismos fisiopatológicos de este trastorno y con potencial para identificar perfiles metabólicos dentro del espectro.

#### **1.4.4 Metales Pesados**

Una de las teorías etiopatogénicas más estudiada es la posibilidad de que una intoxicación con metales pesados podría contribuir a producir los síntomas del TEA, especialmente por el mercurio (Hg). El Hg un es metal que no cumple ninguna función biológica en el organismo, y su presencia en el cuerpo por tanto es exógena, procedente fundamentalmente de la ingesta de alimentos contaminados, especialmente pescados de gran tamaño y de la industria. El



exceso de Hg en el organismo solo puede deberse a dos factores, un aumento en su aporte o un déficit en su eliminación, la cual parece ser la que tendría una mayor relación con el TEA. El mercurio es oxidado en los eritrocitos gracias a la acción del GSH, y es eliminado fundamentalmente por las heces a través de la bilis, por orina y mediante la incorporación al cabello. El mercurio no oxidado es muy liposoluble, y puede atravesar la BHE y producir toxicidad neuronal (Flora, 2009).

La utilización del timerosal, compuesto organomercúrico empleado como conservante en las vacunas ha creado una enorme controversia sobre la posibilidad de que exista relación entre la vacunación y el TEA. Bernard et al (2001), plantearon por primera vez la hipótesis de que el TEA se relaciona con la toxicidad por Hg, basada en la similitud de los síntomas de la intoxicación crónica del Hg y los del TEA. Este estudio ha sido citado a menudo en los trabajos que apoyan los tratamientos de quelación de metales pesados y la toxicidad por timerosal, aunque Nelson et al (2003), examinaron ambas entidades y concluyeron que en el autismo no se aprecian manifestaciones propias de la intoxicación por mercurio como la ataxia, las alteraciones visuales, neuropatía periféricas, hipertensión, erupción cutánea o la trombocitopenia. Sin embargo en una reciente revisión, Geier et al (2018), informó sobre la plausibilidad biológica de la intoxicación por Hg para inducir el Trastorno Generalizado del Desarrollo, rechazando la hipótesis de Nelson, a pesar de que la citada entidad no es equivalente al TEA, si no que supone un grupo de trastornos más heterogéneos (APA, 2000). Por su parte, Wecker et al (1985), no detectaron diferencias significativas de la cantidad de Hg en el pelo de niños TEA en relación con controles, aunque Holmes et al (2003), determinaron que los niños con TEA tenían niveles inferiores de Hg en cabello y que este posible déficit de la eliminación de Hg podría relacionarse con los efectos tóxicos del metal y la sintomatología del TEA, aunque en un meta-análisis Kwok et al (2007), no encontraron suficientes evidencias para demostrar que los niveles de mercurio en el cabello de pacientes con TEA es inferior al de los controles. El mismo análisis determinó que la exposición al timerosal no aumentaba significativamente el riesgo de desarrollar TEA. Sin embargo Kern et al (2016), en una revisión de la literatura encontró 91 estudios que examinan la posible relación entre el Hg y el TEA desde 1999



hasta febrero de 2016. De estos estudios, la gran mayoría (74%) sugiere que el Hg es un factor de riesgo para el TEA.

Pese a que de momento no existe evidencia de la participación del Hg como factor determinante en el desarrollo del TEA, se han desarrollado diversos estudios que valoran las terapias de quelación en pacientes con TEA. Así, Lonsdale et al (2002), afirmaron que la terapia de quelación puede tener efectos beneficioso en algunos niños con TEA, y Bradstreet y col (2003), estudiando la carga corporal de metales pesados en niños con TEA informaron que la eliminación urinaria de Hg aumentó 3,1 veces tras administrar ácido 2-3 dimercapto succínico (DMSA).

Otros metales pesados se han relacionado con el TEA. Blaylock y col (2009), determinó que la exposición al aluminio podría empeorar los síntomas de los pacientes con TEA, posiblemente por un aumento del estrés oxidativo a nivel cerebral, y Al-Ayadhi (2005), halló niveles significativamente mayores de arsénico, antimonio, cadmio, plomo y Hg en niños con TEA en comparación con niños sanos. Por su parte Blaucok et al (2012), administraron DMSA a una cohorte de niños con TEA e informaron de un aumento significativo de la eliminación urinaria de Hg, cadmio y plomo tras la terapia de quelación, y que existió una mejoría de la severidad de los síntomas autistas medidas por The Childhood Autism Rating Scale (CARS), resultados en consonancia con los de Adams et al (2009), que afirmaron que la severidad del TEA podría estar relacionada significativamente con la presencia de metales pesados en el organismo.

#### **1.4.5 Microbiota intestinal**

Numerosos estudios han evaluado la presencia de alteraciones gastrointestinales (GI) en el TEA y su posible implicación en el desarrollo de dicho trastorno. En este sentido Coury et al (2012), en una revisión al respecto informaron que la prevalencia de alteraciones gastrointestinales entre los pacientes con TEA oscila entre el 9 y el 91%, presentando dolor o malestar abdominal entre el 2 y el 41%, diarrea entre el 3 y el 77%, diarrea crónica del 8 al 19% y estreñimiento del 6 al 45%. Por el momento se desconoce la relación entre las alteraciones GI y la etiología o los síntomas del TEA, siendo necesarios más estudios que traten de aclarar esta situación.

Dentro de las alteraciones GI en el TEA, la alteración de la microbiota intestinal es una de las líneas de investigación más reciente. Existe una hipótesis de que una alteración en la permeabilidad intestinal junto con alteraciones en la flora al mismo nivel pueden participar en la sintomatología autista. Son varios los estudios que han informado sobre una alteración en la función de la barrera intestinal (de Magistris et al, 2010), y recientemente Altieri et al (2011), informaron de un aumento significativo en pacientes TEA de productos bacterianos en la orina como el p-cresol. Por su parte Finegold et al (2008 y 2010), informaron de un recuento superior de especies de *Clostridium*, *Bacteroides* y *Firmicutes* en niños con TEA respecto a controles. Además, recientemente está creciendo la evidencia de que la alteración en la microbiota intestinal puede estar relacionada con alteraciones del comportamiento frecuentes en el TEA como la ansiedad, la reactividad emocional (Heijtz et al 2011; Forsythe et al, 2010; Cryan et al, 2011; Collins et al, 2009) e interferir en el metabolismo de la serotonina (Desbonnet et al, 2008), la cual se plantea como posible marcador biológico en el TEA.

Recientemente Hsiao et al (2013), reprodujeron sintomatología autista en crías de ratón tras activación inmune materna (MIA). Informaron como los cambios en la microbiota intestinal originó la presencia de metabolitos en plasma que originan sintomatología similar a la autista, y posteriormente, la administración de *Bacteroides fragilis* revirtió las alteraciones neurológicas e inmunológicas. Los autores informaron de un aumento de 46 veces de 4-ethylphenylsulfate (4EPS) en el plasma de las crías de ratones MIA que revirtió a niveles normales tras la administración de las cepas de *Bacteroides*. Además, los ratones normales presentan niveles indetectables de 4EPS en plasma, y la administración de 4EPS en ratones sin alteraciones GI originó síntomas similares a la ansiedad. Parece ser que el 4EPS se relaciona con el metabolito p-cresol, que como hemos comentado anteriormente está presente en la orina de algunos pacientes con TEA. De hecho Persico et al (2013), sugieren que el p-cresol podría utilizarse como marcador biológico en el TEA en humanos. En el mismo modelo de ratón, se observó un aumento de otro metabolito, el indolpiruvato, generado por la flora GI a partir del catabolismo del triptófano. Esta elevación del indolpiruvato refieren los autores que podría estar en relación tanto con el indolil-3-acryloylglycine como con los niveles séricos

aumentados de serotonina, ambos posibles biomarcadores del TEA en humanos (Gilbert et al, 2013).

#### **1.4.6 Ácidos grasos poliinsaturados**

A pesar de que existen fármacos aprobados para el tratamiento de las comorbilidades del TEA, no contamos con ninguno para paliar los síntomas cardinales, por lo que de momento no existe un tratamiento curativo (Stepanova et al, 2017). Son por tanto, los programas de atención temprana los únicos que verdaderamente han sido capaces de mejorar las alteraciones conductuales, favorecer el neurodesarrollo y disminuir la gravedad de los síntomas del TEA (Tachibana et al, 2017). Es por esto, que gran parte de las investigaciones que se han desarrollado sobre el TEA en los últimos años se han centrado en la búsqueda de tratamientos coadyuvantes a la intervención psicológica, siendo los suplementos alimenticios posiblemente los más estudiados. A pesar de que existe cierta evidencia de que suplementos como antioxidantes, vitaminas o ácidos grasos (FA) omega-3 pueden favorecer el desarrollo cognitivo, el papel que pueden jugar en la salud mental aún no está bien delimitado (Parletta et al, 2013).

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) de la serie omega-3, que incluyen el ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA), son componentes estructurales de las membranas celulares, especialmente en el SNC y cada vez existe más evidencia de que además de la función estructural, juegan un papel fundamental en el desarrollo del SNC, interviniendo en importantes funciones como el crecimiento y diferenciación neuronal, la sinapsis, la agudeza visual o incluso la regulación de la expresión génica (Lauritzen et al 2016; Schuchardt et al 2010), además de contar con propiedades antiinflamatorias y regulador del estrés oxidativo (Agostoni et al, 2017). En los últimos años, está creciendo el interés en psiquiatría sobre la suplementación con omega-3 en algunos trastornos neuropsiquiátricos como la esquizofrenia, trastornos del humor unipolares y bipolares, trastornos de ansiedad, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), agresión, hostilidad e impulsividad, trastorno límite de la personalidad, abuso de sustancias, anorexia nerviosa y por supuesto TEA (Bozzatello et al, 2016), y aunque ya hay estudios

que muestran el beneficio de la suplementación con omega-3 en el TDAH (Cooper et al, 2016), por el momento son escasos los trabajos que han valorado la eficacia y seguridad de los omega-3 en el TEA y con resultados contradictorios.

Aminger et al (2007), en un pequeño ensayo clínico de 13 pacientes TEA de 5 a 17 años, en el que se administró durante 6 semanas 1.5 grs diarios de omega-3 o placebo, informó de la superioridad del omega-3 al placebo en las subescalas de hiperactividad y la estereotipia de la Aberrant Behavior Checklist (ABC). Sin embargo Mankad et al (2015), en un ensayo clínico también con 1.5 grs de omega-3 FA durante 6 meses en un grupo de 38 pacientes de 2 a 5 años, no alcanzó diferencias significativas entre ambos grupos, medidas por las escalas Pervasive Developmental Disorders Behavioral Inventory (PDDBI) y la puntuación de problemas de externalización del Behavior Assessment System for Children-2 (BASC-2). Además, los cambios en las citoquinas durante el tratamiento no se correlacionaron significativamente con la respuesta al tratamiento. Bent et al, realizaron 2 ensayos clínicos en 2011 y 2014, pero con pacientes diferentes. En el primero de ellos, en una muestra de 27 niños con TEA de 3 a 8 años, a los que se le administró 1.3 g diarios de omega-3 o placebo durante 12 semanas, mostró una correlación negativa entre la interleucina-2 y la hiperactividad, y una fuerte correlación entre cinco ácidos grasos e hiperactividad. En el segundo ensayo clínico, describieron una mejoría en la hiperactividad en el grupo tratado con omega-3 sin alcanzar de nuevo la significación estadística, y mejorías en las subescalas de estereotipia y letargo estadísticamente significativas. Por su parte Voigt et al (2014), reportó que la suplementación dietética con 200 mg de DHA/día durante 6 meses no mejora los síntomas centrales del TEA medidos por la escala Clinical Global Impressions-Improvement (CGI-I), y que de los 48 pacientes reclutados, solo 3 niños (6%) tenían niveles bajos de DHA y 1 (2%) tenía un nivel bajo de EPA, pero ninguno tenía un nivel bajo de ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA; 18:3n-3), ácido docosapentaenoico (DPA; 22:5n-3) o niveles totales de omega-3, e incluso 10 niños (21%) tenían niveles altos de DHA, 11 (23%) niveles altos de ALA, 4 (8%) niveles altos de EPA y 7 (15%) niveles altos de omega-3 totales. En cambio Yui et al (2012), en un pequeño ensayo de 13 pacientes, informó de mejoras significativas en la retracción social de la ABC y

en la comunicación de la Social Responsiveness Scale, y que existieron diferencias significativas en el cambio en los niveles de transferrina en plasma y una tendencia hacia una diferencia significativa en el cambio en los niveles de SOD en plasma entre los 2 grupos.

Tres son hasta el momento los metaanálisis que han analizado la suplementación con FA en el TEA. El primer metanálisis (James et al, 2011), que incluyó solo dos ensayos clínicos, no pudo mostrar ningún beneficio en la administración de omega-3 en el TEA. Posteriormente Horvath et al (2017), tampoco demostró un impacto positivo significativo de la suplementación de omega-3 en la mayoría de las subescalas de la ABC. Finalmente Cheng et al (2017), concluyó que la suplementación con FA omega-3 puede mejorar la hiperactividad, la letargia y estereotipias en pacientes con TEA, aunque no parece mejorar el funcionamiento global. En los estudios analizados los suplementos variaron con respecto a la dosis y la fuente de omega-3 DHA y EPA. Las dosis variaron desde 0.2 g DHA/día hasta 1.5 g EPA + DHA/día. Las fuentes de suplementos de omega-3 incluyeron aceite de pescado y aceite de algas. Las intervenciones duraron desde las 6 semanas hasta los 6 meses (Cheng et al, 2017).

## **2-HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

### **Hipótesis**

En la etiopatogenia y evolución del TEA se han descrito varias hipótesis posibles como alteraciones en parámetros bioquímicos, inflamatorios, estrés oxidativo, o incluso alteraciones metabólicas tras la exposición a metales pesados y diferencias en la microbiota intestinal que podrían influir de forma negativa en el correcto establecimiento de sinapsis neuronales y su funcionamiento, en una situación de mayor plasticidad sináptica, especialmente durante la infancia.

### **Objetivo principal**

Evaluar los niveles de citoquinas proinflamatorias y los biomarcadores de estrés oxidativo, así como el perfil de ácidos grasos, la concentración de metales pesados o diferencias en la microbiota intestinal en una muestra de pacientes con TEA infantil y compararlos con un grupo de niños sanos de la misma edad.

### **Objetivos secundarios**

- 1- Evaluar los parámetros de inflamación , el perfil de ácidos grasos y estrés oxidativo en ambos grupos de niños.
- 2- Estudiar la composición de la microbiota intestinal de niños con TEA y estudiar la relación con síntomas de la enfermedad y otros gastro-intestinales, así como comparación con el grupo de niños sanos.
- 3- Realizar una biomonitorización de metales pesados en muestras de pelo y orina de niños con TEA y estudiar la relación con los síntomas de la enfermedad y comparación con el grupo de niños sanos.



### **3 MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 Diseño de los estudios**

Se ha realizado un estudio prospectivo observacional, y además un ensayo clínico doble ciego aleatorizado controlado por placebo en grupos paralelos en pacientes menores de siete años diagnosticados de TEA por la Unidad de Salud Mental Infantil y Juvenil (USMIJ) del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba (HURS), en base a los criterios DSM-5 y la Escala de Observación para el Diagnóstico de Autismo-2 (ADOS-2). En las Unidades de Neuropediatría e Investigación Pediátrica y USMIJ del HURS se han realizado la historia clínica, las exploraciones complementarias y toma de muestras o procesamiento de las muestras. En colaboración con el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II y el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos "José Mataix" de la Universidad de Granada se han medido los diferentes parámetros bioquímicos, estudio metabólico y estudio de la microbiota de las muestras estudiadas en sangre, orina, y heces. El estudio de metales pesados se ha realizado en cabello y orina en el Departamento de Toxicología de la Universidad de Granada. Los resultados se compararon con los de niños sanos de la misma edad.

Este estudio ha constado de 2 fases: una primera fase que incluye el reclutamiento de los niños con TEA y un grupo control que ha permitido realizar un estudio descriptivo observacional de la muestra pediátrica en estudio con respecto a su estado nutricional, características demográficas y estudio basal de parámetros oxidativos, inflamación y moléculas de adhesión celular, metales pesados y microbiota intestinal comparándolos con un grupo control de niños sanos de la misma edad

Una segunda fase con un ensayo clínico en fase III, de no inferioridad, unicéntrico nacional con carácter independiente sin interés comercial para valorar la eficacia y seguridad del DHA en el grupo de niños autistas. Los pacientes con TEA fueron incluidos en el ensayo de forma consecutiva, y se dividieron en dos grupos paralelos de acuerdo a la aleatorización generada por el programa informático SIGESMU® con asignación aleatoria 1:1: la mitad de sujetos con TEA recibieron 800mg de DHA y 350 mg de EPA al día y la otra mitad, un placebo de características lipídicas similares salvo que no tenía



contenido en DHA y EPA, y durante un periodo de 6 meses, doble ciego. Transcurrido los 6 meses, se volvió a realizar una evaluación clínica y el mismo estudio analítico basal.

### ***Intervención***

El suplemento nutricional empleado es un producto comercializado de acuerdo a la regulación de la Unión Europea. Este suplemento (EUPOLY-3® DHA Infant) fue provisto por Biosearch SA (Granada, España), así como el placebo, en idénticos contenedores etiquetados con un código numérico (Código de producto: EUP007). La composición de ambos difiere únicamente en que la fórmula con DHA es de aceite de pescado refinado y estabilizado mediante la adición de lecitina de soja, tocoferoles de origen natural y palmitato de ascórbico. Además, está controlado su nivel de tóxicos en la materia prima. Este producto, y el placebo, mantienen el resto de perfil de ácidos grasos similar (ej. contenido en ácidos grasos linoleico y linolénico). Se preparó en una formulación adecuada a niños con TEA, en forma líquida y en una dosis concentrada para ingerir vía oral en la menor cantidad posible (aproximadamente 2 cc en cada toma). El plan de adherencia a la intervención incluyó llamadas telefónicas de los pediatras investigadores a los tutores cada 2 meses con las que se valoró la evolución, incidencias, administración y tolerancia del producto.

### ***Incidencia de acontecimientos adversos***

Un acontecimiento adverso (AA) se define como cualquier episodio médico no deseado que se produzca en un voluntario durante su participación en el estudio, se considere o no relacionado con el mismo. Tras evaluar la bibliografía respecto al uso del DHA en la dosis que se precisa en este ensayo y teniendo en cuenta el documento de la Autoridad Europea para la Seguridad de los Alimentos (EFSA, 2012), es improbable que se produzcan reacciones adversas. Aun así, los acontecimientos adversos se han evaluado siguiendo el criterio establecido por la norma europea EN ISO (Europea+internacional) 14155-1, relativa a la protección de los participantes en estudios clínicos, según la cual un acontecimiento adverso se considera grave (AAG) en el caso de que:

- a) Amenace la vida del voluntario.

b) Provoca un deterioro de la salud, es decir, causa una enfermedad o lesión potencialmente mortal o una insuficiencia permanente o un ingreso hospitalario o una intervención médica o quirúrgica para prevenir una insuficiencia.

Todos aquellos AA que no cumplan los criterios de “grave” se consideran no graves. Si existen sospechas razonables que indiquen que la medicación del estudio tiene una relación causal con el AA, es decir, hay hechos (indicios) o argumentos que sugieren dicha relación, se considerará el algoritmo de causalidad usado por el Sistema Español de Fármaco-Vigilancia (Karch y Lasagna modificado).

El investigador principal recogió en el cuaderno de datos, todos los AA que se manifestaron desde el momento en que el paciente firma el consentimiento informado hasta la última visita de seguimiento. Estos datos quedaron reflejados en los cuadernos de recogida de datos. Aquellos pacientes que sus padres o tutores notificaron un posible efecto adverso "no grave" fueron controlados más estrechamente y en caso de persistencia serían notificados oficialmente a la dirección del hospital. El grupo adquirió una póliza de responsabilidad civil para ejecutar este ensayo clínico.

### ***Control de sesgos***

Las medidas para tratar de eliminar los factores de sesgo son en primer lugar la asignación aleatoria de los pacientes a los diferentes tratamientos del estudio, proporción de asignación 1:1 mediante el programa informático SIGESMU®. El diseño es doble ciego, el paciente y el investigador desconoce los tratamientos recibidos. Para asegurar que los pacientes e investigadores permanezcan ciegos, la preparación del placebo se llevó a cabo en la empresa que preparó el producto, de forma que estuvo lo suficientemente enmascarado, con un envase y etiquetado igual, y ambos productos presentaban propiedades organolépticas similares. Para evitar posibles sesgos debido a la retirada de pacientes tras la aleatorización, se ha llevado a cabo un análisis por intención de tratar. Otras acciones para evitar sesgos han sido: homogeneizar criterios y diagnosticar con gran rigor a los pacientes con TEA para evitar asociación con otras alteraciones cognitivas que alteren los resultados o que afecten al incumplimiento del tratamiento, y no variar las condiciones del ensayo.

### **3.2 Sujetos de estudio**

Se seleccionó una muestra de 54 niños con TEA (45 niños y 9 niñas) de 2 a 6 años de edad. El diagnóstico de TEA se basó en el juicio clínico de profesionales especializados en la identificación de los perfiles de desarrollo característicos de los sujetos con TEA. La información se obtuvo de entrevistas de desarrollo clínico semiestructuradas y pruebas psicológicas y de comportamiento reconocidas internacionalmente como fiables y válidas para este propósito. En este estudio, dos psicólogos clínicos, un psiquiatra y un terapeuta ocupacional con amplia experiencia clínica y capacitación en pruebas de diagnóstico para la investigación en TEA realizaron el diagnóstico utilizando los criterios establecidos por el DSM-5. Dos pediatras especializados revisaron la historia clínica y realizaron una valoración antropométrica, exploración física y analítica general, con el fin de descartar cualquier patología asociada al TEA.

La velocidad de reclutamiento del grupo de niños con TEA dependió del número de pacientes activos en la USMIJ con reciente diagnóstico, y de la incidencia de niños con TEA. Se requirieron 18 meses para alcanzar la cifra de 54 pacientes que finalmente incluimos en el estudio.

#### ***Criterios de inclusión***

- Pacientes con TEA de 2 a 6 años diagnosticados según los criterios DSM-5 y validados por el ADOS-2 score.

#### ***Criterios de exclusión***

- Cualquier otra patología asociada al TEA.
- Estar recibiendo medicación por comorbilidades del TEA o por otra patología.
- Estar recibiendo o haber recibido cualquier tipo de suplemento alimenticio.
- Estar llevando a cabo dietas específicas con fines terapéuticos.
- Tener planificado modificar en los próximos meses el tipo o el número de horas de intervención de atención temprana.

En el caso del ensayo clínico, se establecieron además unos criterios de retirada:

#### ***Criterios de retirada***

- Niños que no mantengan una adherencia o cumplimiento adecuado al tratamiento según valoración por el investigador.
- Niños en los que no se pueda completar el estudio por dificultades en la obtención de las muestras.

-Aparición de patología neurológica asociada que no permita tener un diagnóstico único de TEA.

De los 56 pacientes inicialmente preseleccionados, 2 fueron excluidos, uno por presentar enfermedad celiaca y otro por estar en tratamiento con DHA.

Asimismo se seleccionó un número similar de niños controles sanos de la misma edad con un neurodesarrollo típico. Debido a la dificultad de seleccionar controles sanos de corta edad para realizarles una venopunción para la extracción sanguínea, éstos fueron seleccionados de un grupo de pacientes en lista de espera para ser intervenidos de patología no inflamatoria, siendo en la mayoría de los casos fimosis o hernias abdominales no complicadas, y en los que se confirmara ausencia clínica y analítica de enfermedad. Esta selección la realizaron facultativos especialistas en Pediatría de la Unidad de investigación Pediátrica del HURS que habitualmente atienden a pacientes con patologías metabólicas y neurológicas.

Para establecer de forma adecuada el diagnóstico, y para establecer la gravedad de los pacientes con TEA se realizaron los siguientes tests o cuestionarios:

a) **Escala de Observación para el Diagnóstico de Autismo (Autism Diagnostic Observation Schedule-2 (ADOS-2))** (Lord et al, 2001). Esta es una escala de evaluación estandarizada y semiestructurada que valora la comunicación, la interacción social, el juego y el uso imaginativo de objetos. Todos los niños con TEA en el estudio superaron los puntos de corte para el diagnóstico de TEA.

b) **Inventario General de Comportamiento de Trastornos del Desarrollo (Developmental Disorders Behavior Inventory Parent Ratings (PDDBI))** (Cohen, 2003). Esta prueba, administrada a todos los padres de niños con TEA, tenía como objetivo evaluar el déficit conductual característico del TEA (déficits en la interacción social, lenguaje y comunicación pragmática y estereotipada), dificultades de comportamiento adicionales (miedos, comportamientos agresivos) y conductas adaptativas (escalas de las habilidades sociales, lingüísticas y de aprendizaje de los niños). Se utilizó para medir la gravedad de la

sintomatología autista y para llegar a un consenso sobre el diagnóstico. Todos los niños con TEA en el estudio obtuvieron una puntuación  $\geq$  a 30.

c) **Escala de Valoración de Autismo Infantil** (Childhood Autism Rating Scale (**CARS-2**)) (Sholper et al, 2010). Esta escala se utilizó para la cuantificación de la gravedad de la patología del autismo: leve, moderada o grave.

d) **Cuestionario de Fortalezas y Dificultades** (Strengths and Difficulties Questionnaire (**SDQ**))(Goodman, 1997): Se utilizó para evaluar la presencia de dificultades de comportamiento, así como las conductas adaptativas.

### **3.3 Historia clínica, exploración física, antropometría y encuesta nutricional**

En los pacientes seleccionados diagnosticados de TEA, un neuropediatra del grupo de investigación y la psicóloga clínica realizaron de manera coordinada las siguientes actuaciones: exploración física general y una evaluación del nivel de afectación de las diferentes áreas del desarrollo por medio de: Inventario Battelle, ADI-R, ADOS-2, CARS-2, SDQ, y PDDBI. Al grupo control se le realizó una historia clínica detallada, valorando el motivo de consulta, junto con la exploración física.

En ambos grupos se midieron el peso, la talla, y el índice de masa corporal (IMC) de acuerdo con las tablas recomendadas de antropometría de la población infantil española (Hernández et al, 1998). Se realizó una encuesta dietética normalizada de frecuencia de consumo para obtener información sobre los hábitos alimentarios. La ingesta energética diaria y la composición de la dieta por macronutrientes se calculó mediante un programa informático, realizando una aproximación entre los datos de la encuesta normalizada de frecuencia de consumo y las tablas de composición de los alimentos españoles de la base de datos BEDCA (Bedca.net, 2014).

### **3.4 Extracción sanguínea y análisis bioquímicos en plasma y eritrocitos**

Las extracciones de las muestras sanguíneas se realizaron en los días 0 y al finalizar la intervención en los dos grupos de pacientes con TEA, y una sola muestra basal en el grupo control. Tras 12 h de ayuno, se extrajeron 6 ml de sangre, que se dividieron en tres tubos, dos con EDTA y otro con gelosa, para obtención de plasma, suero, leucocitos y eritrocitos. Las muestras se guardaron a -80°C en diferentes alícuotas codificadas hasta la realización de las determinaciones que se detallan, para evitar variaciones interensayo.

- Alícuota 1: hemograma y bioquímica general: proteínas, glucosa, urea, creatinina, iones, transaminasas (AST, ALT y GGT), triglicéridos, colesterol total, LDLcolesterol, LDLcolesterol, apoproteínas B y A-I, ácido úrico y proteína C-reactiva ultrasensible. Se han determinado mediante análisis colorimétricos y enzimáticos específicos, utilizando un autoanalizador con métodos estandarizados y controlados interlaboratorios mediante test de control de calidad.

- Alícuota 2 (plasma y eritrocitos): ácidos grasos totales, perfil de ácidos grasos. Primero se hizo la extracción de lípidos plasmáticos y a continuación se determinó la composición en ácidos grasos del plasma en un cromatógrafo de gas-líquido.

- Alícuota 3: sE-Selectina, moléculas de adhesión celular vasculares e intercelulares (sVCAM-1, sICAM) y factor inhibidor del plasminógeno 1 (PAI-1) e interleuquinas 1- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, INF- $\gamma$ , MCP-1, TNF- $\alpha$ .

El análisis de los biomarcadores de inflamación se llevó a cabo mediante detección simultánea de multi-analitos utilizando kits de ensayo LINCOplex y la Tecnología de detección LuminexMAP

- Alícuota 4: análisis de metabolómica en plasma. Las muestras de plasma se analizaron con una metodología de plataforma única de metabolómica basada en cromatografía líquida-espectrometría de masas. Se realizó un análisis univariado y multivariado, incluyendo discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales. Se realizaron modelos de análisis y gráficos de estructuras únicas y compartidas utilizando MetaboAnalyst 4.0 y SIMCA-P 15.

- Alícuota 5 (plasma): capacidad antioxidante total del plasma (ABTS) y parámetros de estrés oxidativo como GSH y GSSG. Determinación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un detector electroquímico.

- Alícuota 6: eritrocitos para determinación de actividades de enzimas relacionadas con el sistema de defensa antioxidante celular: SOD, catalasa, GR, GSH-Px. Se realiza mediante kits comerciales y métodos espectrofotométricos.
- Alícuota 7 (plasma y eritrocitos): vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), retinol,  $\alpha$ -caroteno, vitamina C, coenzima Q10. El análisis se lleva a cabo mediante HPLC con detección electroquímica.

### **3.5 Análisis de la microbiota intestinal**

**a) Muestras de heces, extracción de DNA y secuenciación masiva:** las muestras de heces se recolectaron en botes de plásticos estériles conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La extracción de DNA se realizó con el mini kit QIAamp DNA stool (QIAGEN, Barcelona, España). Posteriormente, la cuantificación se efectuó en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Nano-Drop Technologies). Las muestras de DNA recibidas, se amplificaron en la región variable V3-V1 del gen 16S del RNA ribosomal con un tamaño de 600 pares de bases (pb), utilizando cebadores marcados con códigos de barras. La secuenciación masiva de la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en el equipo Roche/454 GS Titanium (Branford, CT, USA).

**b) Análisis taxonómico:** las secuencias han sido seleccionadas para estimar la diversidad total de bacterias de las muestras de DNA de una manera comparable. Las secuencias seleccionadas se sometieron a un análisis con la plataforma RDP (Ribosomal data project) para definir las unidades taxonómicas operacionales, de su sigla OTU en inglés. La secuencia más abundante de cada OTU se seleccionaron como representante de la secuencia y se clasificó taxonómicamente mediante una búsqueda BLAST.

### **3.6 Estudio de metales pesados en cabello y orina**

Se recogió un mínimo de 100 mg de cabello de la parte occipital del cuero cabelludo de los niños participantes. Las muestras de cabello se transportaron y almacenaron en bolsas de papel hasta su análisis. Se recogieron muestras de orina de una micción espontánea. Las muestras se transportaron refrigeradas a  $-4^{\circ}\text{C}$  hasta el laboratorio donde se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Todos

los metales pesados objeto de estudio (Cd, Hg, Mn y Pb) se analizaron por medio de un espectrofotómetro de absorción atómica equipado con cámara de grafito en el Departamento de Toxicología de la Universidad de Granada.

Todas estas variables secundarias se han medido al inicio del estudio y tras la intervención de 6 meses de tratamiento con 800mg de DHA y 350 mg de EPA/día en comparación con otro grupo homogéneo que recibió placebo. Además, se compararon con el grupo de referencia de niños sanos a nivel basal.

### **3.7 Análisis estadístico**

Para el cálculo del tamaño muestral se utilizó el software GRANMO (2012) y se tuvo en consideración la necesidad de incluir niños sanos y TEA, y estos últimos sometidos a una intervención (con DHA o sin DHA). Además, en la bibliografía consultada (Parletta et al, 2016), se conoce que los niveles medios de DHA eritrocitario pueden oscilar alrededor de 4.97 (+/-1.02). Por tanto, aceptando un riesgo alfa de 0.05 y un riesgo beta de 0.2 en un contraste bilateral y para detectar una diferencia igual o superior a 2.5 unidades con una estimación de una tasa de pérdidas de seguimiento del 5%:

- En el caso de grupos independientes (sanos-TEA) se precisan 46 sujetos en cada grupo. Se asume que la desviación estándar común es de 0.5.
- En el caso de grupos relacionados (TEA con/sin DHA, para evaluación antes-después), se precisan 28 sujetos en cada grupo para detectar una diferencia igual o superior a 1.2 unidades.

Se asume que la desviación estándar común es de 0.7 y un coeficiente de correlación entre la medida inicial y final de 0.5.

En definitiva, se precisarían 112 niños en total, 56 niños sanos (se amplía al mayor tamaño de muestra) y 56 niños con TEA para detectar estas diferencias.

Todos los análisis de datos se han llevado a cabo con el paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 21.0. El análisis estadístico consistió en un estudio descriptivo de las variables continuas mediante la media  $\pm$  desviación estándar o mediana y rango intercuartílico. Las variables cualitativas se expresan en frecuencias absolutas o relativas. La distribución de las variables se determinaron mediante la prueba



de Shapiro-Wilk test y la homogeneidad de las varianzas se realizó mediante el test de Levene. Las diferencias entre los valores medios de cada grupo se realizó mediante la prueba t de Student, o U de Mann-Whitney dependiendo de la idoneidad. Las comparaciones de variables continuas entre sujetos de los mismos grupos (basal vs. tiempo de intervención final), entre sujetos de diferentes grupos y la interacción tiempo x tratamiento se llevó a cabo mediante modelos lineales de varianza. La asociación entre variables diferentes multidependientes se hizo mediante test de regresión múltiple.

### **3.8 Aspectos Éticos**

El estudio ha sido elaborado respetando los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki (1964), en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina (1997), en la Declaración Universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos (1997), así como cumpliendo los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética. El estudio ha sido aprobado por los Comités de Ética correspondientes, y ha seguido las normas de la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica y la Ley Orgánica 15/1999, RD 1720/2007 de protección de datos de carácter personal así como las internacionales para las investigaciones que utilizan muestras procedentes de seres humanos. Los padres o tutores firmaron el consentimiento informado para poder participar en el estudio tras ser informados por los investigadores. Además, se les dio a los niños, la información verbal de forma comprensible, y se tendrá en cuenta su decisión siempre y cuando sea posible, teniendo en cuenta su nivel de discapacidad.

## **4 RESULTADOS**

De este proyecto se han derivado hasta ahora las siguientes 3 publicaciones que cumplen con los criterios de calidad para defender esta tesis doctoral, en revistas con factor de impacto en JCR y clasificadas en Q1 y Q2. De ellas, se exponen los resúmenes en castellano a continuación, así como los artículos completos anexos.

**4.1 Antonio Gomez-Fernandez, Maria J. de la Torre-Aguilar, Mercedes Gil-Campos\*, Katherine Flores-Rojas, Maria D. Cruz-Rico, Pilar Martin-Borreguero, Juan Luis Perez-Navero. Children With Autism Spectrum Disorder With Regression Exhibit a Different Profile in Plasma Cytokines and Adhesion Molecules Compared to Children Without Such Regression. Front Pediatr. 2018; 6: 264. doi: 10.3389/fped.2018.00264. ISSN 2296-2360; Factor impacto: 2.349 Pediatrics 33/124, Tercil 2. Q2.**

### **Resumen**

En la etiopatogenia del TEA, se ha sugerido que una afección proinflamatoria, así como una alteración en las moléculas de adhesión en las primeras etapas del desarrollo neurológico, pueden desempeñar un papel en la fisiopatología del trastorno. Este estudio propone evaluar los niveles plasmáticos de ciertas citoquinas inflamatorias, moléculas de adhesión y factores de crecimiento en una muestra de pacientes pediátricos con TEA y compararlos con los niveles en un grupo control de niños sanos.

**Métodos.** 54 niños (45 niños y 9 niñas) de 2 a 6 años de edad, que fueron diagnosticados de TEA, y un grupo de control de 54 niños con un desarrollo típico de edades similares fueron seleccionados. El diagnóstico de TEA se realizó de acuerdo con los criterios del DSM-5 y los datos obtenidos de una entrevista clínica semiestructurada de desarrollo y la prueba de evaluación ADOS-2. Se realizaron pruebas adicionales para identificar el nivel de desarrollo de los niños y la gravedad de la sintomatología de TEA. Los pacientes con TEA se dividieron en dos subgrupos según los parámetros de desarrollo: niños con TEA con regresión en el neurodesarrollo (AMR) y niños con TEA sin regresión en el neurodesarrollo (ANMR). Se realizaron análisis de moléculas plasmáticas, tales como catepsina, IL1 $\beta$ , IL6, IL8, MPO, RANTES,

MCP, BDNF, NCAM PAI, SICAM, SVCAM Y NGF.

Resultados. Se observaron niveles más altos de NGF en el grupo TEA en comparación con los niveles en el grupo de control ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, en el análisis de los subgrupos de TEA, se encontraron niveles más bajos en plasma de NCAM y niveles más elevados de NGF en el grupo de niños con TEA ANMR en comparación con los niveles en el grupo de niños con desarrollo típico.

Conclusiones. Estos resultados sugieren diferencias que podrían estar relacionadas con diferentes mecanismos fisiopatológicos en el TEA. No existe un perfil específico relevante para la expresión de citoquinas plasmáticas, moléculas de adhesión o factores de crecimiento en niños con TEA en comparación con el de niños con desarrollo típico. Sin embargo, en los subgrupos de TEA ANMR y AMR, algunas de las moléculas de adhesión y los factores de crecimiento neuronal muestran diferencias que pueden estar relacionadas con la sinaptogénesis.

**4.2 Julio Plaza-Díaz\*, Antonio Gómez-Fernández\*, Natalia Chueca, María José de la Torre-Aguilar, Ángel Gil, Juan Luis Perez-Navero, Katherine Flores-Rojas, Pilar Martín-Borreguero, Patricio Solis-Urra, Francisco Javier Ruiz-Ojeda, Federico Garcia, Mercedes Gil-Campos. Autism Spectrum Disorder (ASD) with and without Mental Regression is Associated with Changes in the Fecal Microbiota. Nutrients. 2019 Feb 5;11(2). pii: E337. ISSN 2072-6643, DOI: 10.3390/nu11020337. FI 2018: 4,171. Categoría Nutrition and Dietetics: 16/86, Tercil 1. Q1**

**\* ambos autores han contribuido igual**

Resumen

Las nuevas tecnologías de secuenciación de microbiomas proporcionan información novedosa sobre las posibles interacciones entre los microorganismos intestinales y el huésped en algunas neuropatologías como el TEA. El eje microbiota /intestino/cerebro es un aspecto emergente en la generación de comportamientos autistas; la evidencia en modelos animales sugiere que los cambios microbianos intestinales pueden producir cambios que se ajustan al cuadro clínico del autismo. El objetivo del presente estudio fue evaluar los perfiles metagenómicos fecales en niños con TEA y compararlos

con controles sanos. Esta comparación nos permite determinar cómo la regresión mental (una variable importante en el TEA) podría influir en el perfil de la microbiota intestinal. Por este motivo, se realizó una subclasificación en niños con TEA en AMR y ANMR. El presente trabajo fue un estudio observacional descriptivo. Cuarenta y ocho niños de 2 a 6 años con TEA se incluyeron: 30 ANMR y 18 AMR. Además, se seleccionó un grupo de control de 57 niños con un neurodesarrollo típico y se comparó con el grupo de TEA por sexo y edad.

Las muestras fecales se analizaron con un enfoque metagenómico utilizando una plataforma de secuenciación de próxima generación. Se detectaron varias diferencias entre los niños con TEA, en comparación con el grupo sano. Es decir, Actinobacteria y Proteobacteria a nivel de Phylum, así como Actinobacteria, Bacilli, Erysipelotrichi y Gammaproteobacteria a nivel de clase se encontraron en proporciones más elevadas en los niños con TEA. Además, los niveles de Proteobacterias mostraron un aumento exclusivo en niños con AMR. Los resultados preliminares, utilizando un análisis de componentes principales, mostraron patrones diferenciales en niños con TEA, ANMR y AMR, en comparación con el grupo sano, tanto para la microbiota intestinal como para los patrones de alimentos. En este estudio, detectamos niveles más elevados de Actinobacteria, Proteobacteria y Bacilli, además de Erysipelotrichi y Gammaproteobacteria en los niños con TEA en comparación con el grupo sano. Además, los niños con AMR presentaron niveles más altos de Proteobacterias. Se necesitan más análisis utilizando estos resultados preliminares y mezclando tecnologías metagenómicas y otras tecnologías "ómicas" en cohortes más grandes de niños con TEA para confirmar estos cambios de microbiota intestinal.

**4.3 O. D. Rangel Huerta\*, A. Gomez Fernández\*, M. J. de la Torre Aguilar, A. Gil, J. L. Perez Navero, K. Flores Rojas, P. Martín Borreguero, M. Gil Campos. Metabolic profiling in children with autism spectrum disorder with and without mental regression: preliminary results from a cross sectional case-control study. Metabolomics 2019; 15:99. doi.org/10.1007/s11306-019-1562-x. FI: 3,167. Categoría: Endocrinology and Metabolism 71/145. Tercil 2. Q2.**

**\* Ambos autores han contribuido igual**

**Resumen**

**Introducción.** Es un desafío establecer los mecanismos involucrados en la variedad de fenotipos clínicos bien definidos en el TEA y las vías involucradas en sus patogenias.

**Objetivos .** El objetivo de este estudio fue evaluar los perfiles metabolómicos de los niños con TEA subclasificados por el fenotipo de regresión del neurodesarrollo AMR y ANMR.

**Métodos.** El presente trabajo fue un estudio transversal de casos y controles. Se incluyeron 30 niños de 2 a 6 años con TEA: 15 AMR y 15 ANMR. Además, se seleccionó un grupo de control de 30 niños con neurodesarrollo típico y se ajustaron el grupo TEA por edad y sexo. Las muestras de plasma se analizaron con una metodología metabolómica de plataforma única basada en cromatografía líquida-espectrometría de masas. Se realizaron análisis univariante y multivariante, incluidos los modelos de análisis ortogonales de mínimos cuadrados-discriminantes parciales y de estructuras únicas y compartidas, utilizando metabo analyst 4.0 y Simca-p 15. El punto final principal fue la caracterización metabólica entre niños sanos y niños autistas y sus subgrupos.

**Resultados.** Se compararon los perfiles metabólicos de 30 niños sanos, 15 AMR y 15 ANMR. Se detectaron varias diferencias entre niños sanos y niños con TEA, que involucran principalmente el metabolismo de aminoácidos, lípidos y nicotinamida. Además, reportamos diferencias entre los grupos AMR y ANMR.

**Conclusiones.** En este estudio, se informa por primera vez, los perfiles metabolómicos plasmáticos de niños con TEA, que incluyen dos fenotipos diferentes de perfiles dependiendo del estado de regresión del neurodesarrollo. El uso de una plataforma de cromatografía líquida-espectrometría de masas para la metabolómica en niños con TEA utilizando plasma parece ser muy eficiente y agrega más apoyo a los hallazgos previos en la orina. Además, el presente estudio documenta varios cambios relacionados con los aminoácidos, NAD<sup>+</sup> y el metabolismo de los lípidos que, tales como alteraciones en las rutas de la arginina y del glutamato, que parecen estar asociadas con el fenotipo AMR. Se necesitan análisis específicos adicionales en una cohorte más grande para validar los resultados presentados en este trabajo.

Existen en proceso de redacción, revisión o publicación, otros trabajos derivados de este proyecto y tesis doctoral, que se resumen a continuación:

**4.4.1 Gomez-Fernández AR, Martin-Borreguero P, de la Torre-Aguilar MJ, Gil-Campos M, Flores-Rojas K, Pérez-Navero JL. Neuropsychological profile in children with autism spectrum disorder with a history of neurodevelopmental regression.**

Resumen

La regresión del desarrollo neurológico no se incluye entre los criterios de diagnóstico para el TEA.

Objetivos. Determinar, en un grupo de niños con TEA, la presencia de regresión del neurodesarrollo en relación con la presencia de manifestaciones Clínicas y la severidad del autismo.

Métodos. Los pacientes con TEA se clasificaron en dos grupos, regresivo (AMR) y no regresivo (ANMR) mediante una escala basada en el autism diagnostic interview-revised (adi-r). La gravedad del TEA y el desarrollo neurológico se evaluaron con pruebas específicas al inicio del estudio y después de 24 meses de seguimiento.

Resultados . Se incluyeron 52 pacientes de 2 a 6 años con TEA; 19 fueron clasificados como AMR y 33 fueron clasificados como ANMR. El grupo AMR presentó una mayor gravedad de los síntomas autistas y puntuaciones más altas de autismo. Además, mostraron un neurodesarrollo general más bajo, según se cuantificó en el inventario de Battelle. A los 24 meses, las diferencias significativas en la gravedad y la evaluación de los síntomas autistas se mantuvieron para ambos grupos, así como en el inventario de Battelle.

Conclusiones. Los grupos AMR y ANMR presentan diferentes manifestaciones clínicas y pronósticos en cuanto a la gravedad de los síntomas autistas y el Desarrollo neurológico. Las investigaciones futuras deberían centrarse en estos fenotipos para determinar si requieren estrategias terapéuticas diferentes.

**4.4.2 Fernando Gil-Hernández\*, Antonio Gómez-Fernández\*,Juan Luis Pérez-Navero, María José de la Torre-Aguilar, Katherine Flores-Rojas, Pilar Martín-Borreguero, Mercedes Gil- Campos. Neurotoxicity by mercury is not associated with autism spectrum disorders in spanish children.**

**\* ambos autores han contribuido igual**

#### Resumen

La etiología fisiopatológica que precipita los síntomas de TEA siguen siendo controvertidos. Diferentes autores han estudiado neurotoxinas como el mercurio y su relación con el TEA. El objetivo de este estudio es evaluar los niveles de hg en el cabello en un grupo de niños con TEA (exposición crónica) y en la excreción urinaria (exposición actual) en comparación con un grupo de control.

Métodos. Se realizó un estudio de casos y controles. Comparamos un grupo de 54 niños con TEA (de 2 a 6 años de edad), sin ninguna otra patología asociada, con un grupo de control con neurodesarrollo típico (54 sujetos).

Resultados. No hubo diferencias en los valores de hg en la orina ( $p: 0,631$ ) y el cabello ( $p: 1$ ) en los porcentajes de las muestras por debajo de los límites de detección entre los grupos control y TEA, y tampoco entre los pacientes con TEA, en el subgrupo con neuroregresión (AMR) ( $p: 0,08$ ) y el subgrupo sin neuroregresión (ANMR) ( $p: 0,705$ ). Cuando el análisis se ajustó por edad y sexo, las diferencias entre los niveles de hg no fueron significativas. No hubo correlaciones entre las concentraciones de hg en el grupo TEA en su conjunto ( $p: 0.739$ ), o cuando se subdividieron en TEA-AMR ( $p: 0.739$ ) y TEA-ANMR ( $p: 0.363$ ).

Conclusiones. El presente estudio no muestra pruebas, en nuestro medio, que respalden una asociación entre la neurotoxicidad por mercurio y la etiopatogenia del TEA.

#### **4.4.3 Gomez-Fernández AR, de la Torre-Aguilar MJ , Gil-Campos M, Martin-Borreguero P, Flores-Rojas K, Pérez-Navero JL. Evaluación de la repercusión del tratamiento coadyuvante con ácido docosahexaenoico en el perfil plasmático de citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión en niños con trastorno del espectro autista**

#### Resumen

En la etiopatogenia del TEA se han descrito varias hipótesis, entre ellas se incluyen las alteraciones en los mecanismos proinflamatorios, que podrían influir de forma negativa en el correcto establecimiento de las sinapsis

neuronales y su funcionamiento. Terapias coadyuvantes con ácidos grasos poliinsaturados omega-3 podrían modificar estas alteraciones.

Objetivo. Evaluar los cambios clínicos y en el perfil de citoquinas y moléculas de adhesión celular plasmática en pacientes pediátricos con TEA tras la suplementación con DHA.

Material y métodos. Se ha realizado un estudio de intervención nutricional unicéntrico e independiente, aleatorizado de grupos paralelos, doble ciego, placebo-control. Se seleccionaron un grupo de 44 niños menores de 7 años diagnosticados de TEA sin ninguna otra patología asociada, subdivididos en dos subgrupos: TEA-i:19, que recibieron 800 mg de DHA y 350 mg de EPA/día durante 6 meses; TEA-noi: 25, subgrupo placebo. Se incluyó un grupo control con 56 niños sanos. El análisis de mieloperoxidasa, PAI-1, RANTES, MCP-1, catepsina, BDNF, NCAM, SICAM-1, SVCAM-1 Y NGF se realizaron en todos los sujetos.

Resultados. Se observaron niveles más elevados de catepsina (p:0002), NCAM (p:0.009), SICAM-1 (p:0.047) en el grupo de TEA sin tratamiento en comparación con el grupo de postratamiento con DHA. En relación con las pruebas de evaluación psicología del TEA se obtuvo significación en el grupo pre-tratamiento con el post-tratamiento con dha en el CARS-2 (p <0001), SDQ al conducta (p: 0.02), SDQ corresponde (p: 0.014), SDQ (p : 0.001).

Conclusiones. La suplementación con dha en pacientes con TEA podrían modificar el perfil de la actividad proteolítica (catesina ) y las moléculas de adhesión celular (NCAM y SICAM-1) e igualmente la intervención con DHA podría modificar síntomas asociados al TEA incluyendo áreas de comunicación e interacción social y alteraciones conductuales.

#### **4.4.4 Gomez-Fernández AR, de la Torre-Aguilar MJ , Pérez-Navero JL, Martin-Borreguero P, Flores-Rojas K, Gil-Campos M. A randomized double blind controlled trial with omega-3 fatty acids in children with autism spectrum disorder. Study protocol**

##### **Resumen**

Existe un creciente interés por la suplementación con DHA en el TEA debido a posibles alteraciones en los procesos de absorción, metabolismo o incluso la



ingesta de ácidos grasos omega-3 en niños con TEA. El objetivo principal fue evaluar los niveles basales de FA en niños con TEA y evaluar la seguridad y eficacia del DHA y EPA tras seis meses de tratamiento.

Material y métodos. Se ha realizado un estudio de intervención nutricional unicéntrico e independiente, aleatorizado de grupos paralelos, doble ciego, placebo-control, y un estudio de casos y controles. Se seleccionó un grupo de 44 niños menores de 7 años diagnosticados de TEA sin ninguna otra patología asociada, subdivididos en dos subgrupos: TEA-i:19, que recibió 800 mg de DHA y 350 mg de EPA/día durante 6 meses; TEA-noi: 25, subgrupo placebo que recibió aceite de girasol alto oleico. Además se seleccionó un grupo control de 56 niños de similar edad y con desarrollo típico. Ambos preparados (tratamiento y placebo) fueron aromatizados con limón para ocultar sus propiedades organolépticas. Se realizaron los cuestionarios CARS, SDQ y PDDBI basal y tras los 6 meses de intervención en ambos grupos de pacientes TEA. Se realizó una determinación basal de los principales FA en los 3 grupos, y tras los 6 meses de intervención en ambos grupos de pacientes TEA.

Conclusiones. El análisis de los datos obtenidos en este estudio nos permitirá valorar la seguridad y eficacia de los FA omega-3 como tratamiento coadyuvante del TEA. Por otro lado, podremos objetivar si existe alguna alteración en los procesos de absorción o metabolismo de los FA en el TEA.

## 5 BIBLIOGRAFIA

Adams JB, Baral M, Geis E, Mitchell J, Ingram J, Hensley A, et al. Safety and efficacy of oral DMSA therapy for children with autism spectrum disorders: Part A-medical results. *BMC Clin Pharmacol*. 2009; 9:16.

Adamas JB, Holloway C, Jeny A. Pilot study of a moderate dose multivitamin/mineral supplement for children with autistic spectrum disorder. *J Altern Complem Med* 2004; 10:1033-1039.

Agostoni C, Nobile M, Ciappolino V, Delvecchio G, Tesei A, Turolo S, et al. The Role of Omega-3 Fatty Acids in Developmental Psychopathology: A Systematic Review on Early Psychosis, Autism, and ADHD. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(12).

Ahlisen G, Rosengren L, Belfrage M, Palm A, Haqlid K, Hamberger A, et al. Glial fibrillary acidic protein in the cerebrospinal fluid of children with autism and other neuropsychiatric disorders. *Biol Psychiatry*. 1993; 33(10):734-743.

AL-Ayadhi L. Y. Heavy metals and trace elements in hair samples of autistic and normal children in central Saudi Arabia. *Neurosciences* 2005; 10:213-218.

Al-Gadani Y, El-Ansary A, Attas O, Al-Ayadhi L. Metabolic biomarkers related to oxidative stress and antioxidant status in Saudi autistic children. *Clin Biochem*. 2009; 42(10-11):1032-1040.

Altieri L, Neri C, Sacco R, Curatolo P, Benvenuto A, Muratori F, et al. Urinary p-cresol is elevated in small children with severe autism spectrum disorder. *Biomarkers*. 2011; 16(3):252-260.

Amminger GP, Berger GE, Schäfer MR, Klier C, Friedrich MH, Feucht M. Omega-3 fatty acids supplementation in children with autism: a double-blind randomized, placebo-controlled pilot study. *Biol Psychiatry*. 2007; 61(4):551-553.

Angelidou A, Asadi S, Alysandratos KD, Karagkouni A, Kourembanas S,

Theoharides TC. Perinatal stress, brain inflammation and risk of autism-review and proposal. BMC Pediatr. 2012; 12:89.

American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. (4th edR) APA, Washington, DC. 1994.

American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-IVTR. 4. American Psychiatric Association Publishing Inc; Washington DC, USA: 2000.

American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5th ed. Arlington, VA: American Psychiatric Association; 2013.

Artigas-Pallarés J, Gabau-Vila E, Guitart-Feliubadaló M. El autismo síndrome: I. Aspectos generales. Neurol 2005; 40 Supl 1:143-149.

Artigas-Pallarés J, Gabau-Vila E, Guitart-Feliubadaló M. El autismo síndrome: II. Síndromes de base genética asociados a autismo. Rev Neurología. 2005; 40 Supl 1:151-162.

Ashwood P, Enstrom A, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen RL, Croen LA, et al. Decreased transforming growth factor beta1 in autism: A potential link between immune dysregulation and impairment in clinical behavioral outcomes. J Neuroimmunol 2008; 204:149-153.

Asperger. Die Autistische psychopathen in kindersalter. Archiv Psychiatrie Nervenkrankheiten 1944; 117:76-136.

Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2008 Principal Investigators; Centers for Disease Control and Prevention. Prevalence of autism spectrum disorders--Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 sites, United States, 2008. MMWR Surveill Summ. 2012; 61(3):1-19.

Bauer S. Cytokine control of adult neural stem cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1153:48-56.

Basterzi A. D, Aydemir C, Kisa C, Aksaray S, Tuzer V, Yazici K, et al. IL-6 levels decrease with SSRI treatment in patients with major depression. *Hum. Psychopharmacol.* 2005; 20:473-476.

Battaglia A, Parrini B, Tancredi R. The behavioral phenotype of the idic(15) syndrome. *Am J Med Genet Part C.* 2010; 154:448-455.

BEDCA . Base de Datos Española de Composición de Alimentos. España [Internet]. Consultado en 2014. Disponible en <http://www.bedca.net/bdpub/>.

Bent S, Bertoglio K, Ashwood P, Bostrom A, Hendren RL. A pilot randomized controlled trial of omega-3 fatty acids for autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord.* 2011; 41(5):545-554.

Bent S, Hendren RL, Zandi T, Law K, Choi JE, Widjaja F, et al. Internet-based, randomized, controlled trial of omega-3 fatty acids for hyperactivity in autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2014; 53(6):658-666.

Berry-Kravis E, Raspa M, Loggin-Hester L, Bishop E, Holiday D, Bailey DB. Seizures in fragile X syndrome: Characteristics and comorbid diagnoses. *Am J Intellect Dev Disabil.* 2010; 115:461-472.

Bernard S, Enayati A, Redwood L, Roger H, Binstock T. Autism: a novel form of mercury poisoning. *Med. Hypotheses* 2001; 56:462-471.

Bertrand J, Mars A, Bove F, Yeargin-Allsopp M, Decoufle P. Prevalence of autism in a United States: the Brick Township, New Jersey, investigation. *Pediatrics.* 2001; 108:1155-1161.

Bitar T, Mavel S, Emond P, Nadal-Desbarats L, Lefèvre A, Mattar H, et al. Identification of metabolic pathway disturbances using multimodal

metabolomics in autistic disorders in a Middle Eastern population. *J Pharm Biomed Anal.* 2018; 152:57-65.

Blaucok-Busch E, Amin OR, Dessoki HH, Rabah T. Efficacy of DMSA Therapy in a Sample of Arab Children with Autistic Spectrum Disorder. *Maedica (Buchar).* 2012; 7(3):214-221.

Blaylock RL, Strunecka A. Immune glutametric dysfunction as a central mechanism of the Autism Spectrum Disorders. *Curr Med Chem.* 2009; 16:157-170.

Bleuler E. *Dementia Praecox or the Group of Schizophrenias.* New York: International Universities. (1950[1911]).

Bonati MT, Russo S, Finelli P, Valsecchi MR, Cogliati F, Cavalleri F, et al. Evaluation of autism traits in Angelman syndrome: A resource to unfold autism genes. *Neurogenetics.* 2007; 8:169-178.

Boulanger LM. Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. *Neuron.* 2009; 64: 93-109.

Bozzatello P, Brignolo E, De Grandi E, Bellino S. Supplementation with Omega-3 Fatty Acids in Psychiatric Disorders: A Review of Literature Data. *J Clin Med.* 2016; 5(8).

Bradstreet J, Geier D. A, Kartzinel J. J, Adams J. B, Geier M. R. A Case-Control study of mercury burden in children with Autistic Spectrum Disorders. *J Am Phys Surg.* 2003; 8:76-79.

Brydon L, Harrison NA, Walker C, Steptoe A, Critchley HD. Peripheral inflammation is associated with altered substantia nigra activity and psychomotor slowing in humans. *Biol Psychiatry.* 2008; 63:1022-1029.

Buiting K. Prader–Willi syndrome and Angelman syndrome. *Am J Med Genet*

Part C. 2010; 154C:365-376.

Carpentier PA, Palmer TD. Immune influence on adult neural stem cell regulation and function. *Neuron*. 2009; 64(1):79-92.

Chauhan A, Audhya T, Chauhan V. Brain region-specific glutathione redox imbalance in autism. *Neurochem Res*. 2012; 37:1681-1689.

Chauhan A, Gu F, Essa MM, Wegiel J, Kaur K, Brown WT, et al. Brain region-specific deficit in mitochondrial electron transport chain complexes in children with autism. *J Neurochem*. 2011; 117:209-220.

Cheng YS, Tseng PT, Chen YW, Stubbs B, Yang WC, Chen TY, et al. Supplementation of omega 3 fatty acids may improve hyperactivity, lethargy, and stereotypy in children with autism spectrum disorders: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2017; 13:2531-2543.

Chez MG, Dowling T, Patel PB, Khanna P, Kominsky M. Elevation of tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of autistic children. *Pediatr Neurol*. 2007; 36(6):361-365.

Chi L, Ke Y, Luo C, Gozal D, Liu R. Depletion of reduced glutathione enhances motor neuron degeneration in vitro and in vivo. *Neuroscience*. 2007; 144:991-1003.

Clifford S, Dissanayake C, Bui QM, Huggins R, Taylor AK, Loesch DZ. Autism spectrum phenotype in males and females with fragileXfull mutation and premutation. *J Autism Dev Disord*. 2007; 37:738-747.

Coffee B, Keith K, Albizua I, Malone T, Mowrey J, Sherman SL, et al. Incidence of fragile X syndrome by newborn screening for methylated FMR1 DNA. *Am J Hum Genet*. 2009; 85:503-514.

Collins SM, Bercik P. The relationship between intestinal microbiota and the

central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. *Gastroenterology*. 2009; 136(6):2003-2014.

Cohen IL. Criterion-related validity of the PDD Behavior Inventory. *J Autism Dev Disord*. 2003; 33:47-53.

Cooper RE, Tye C, Kuntsi J, Vassos E, Asherson P. The effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on emotional dysregulation, oppositional behaviour and conduct problems in ADHD: a systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord*. 2016; 190:474-482.

Coury DL, Ashwood P, Fasano A, Fuchs G, Geraghty M, Kaul A, et al. Gastrointestinal conditions in children with autism spectrum disorder: developing a research agenda. *Pediatrics*. 2012;130 Suppl 2:160-168.

Cryan JF, O'Mahony SM. The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterol Motil*. 2011; 23(3):187-192.

de Araujo EG, da Silva GM, Dos Santos AA. Neuronal cell survival: the role of interleukins. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1153:57-64.

de Magistris L, Familiari V, Pascotto A, Sapone A, Froli A, Iardino P, et al. Alterations of the intestinal barrier in patients and their first-degree relatives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010; 51(4):418-424.

Depienne C, Moreno-De-Luca D, Heron D, Bouteiller D, Gennetier A, Delorme R, et al. Screening for genomic rearrangements and methylation abnormalities of the 15q11-q13 region in autism spectrum disorders. *Biol Psychiatry*. 2009; 66:349-359.

Depino AM, Lucchina L, Pitossi F. Early and adult hippocampal TGF-beta1 overexpression have opposite effects on behavior. *Brain Behav Immun*. 2011; 25:1582-1591.

Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Bienenstock J, Dinan TG. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *J Psychiatr Res*. 2008; 43(2):164-174.

Descheemaeker MJ, Govers V, Vermeulen P, Fryns JP. Pervasive developmental disorders in Prader-Willi syndrome: the Leuven experience in 59 subjects and controls. *Am J Med Genet A*. 2006; 140(11):1136-1142.

Deverman BE, Patterson PH. Cytokines and CNS development. *Neuron*. 2009; 64(1):61-78.

Díaz-Hung ML, González Fraguola ME. El estrés oxidativo en las enfermedades neurológicas: ¿causa o consecuencia? *Neurología: Publicación oficial de la Sociedad Española de Neurología*. 2013; 29(8):451-452.

Drexhage RC, Hoogenboezem TA, Cohen D, Versnel MA, Nolen WA, van Beveren NJ, et al. An activated set point of T-cell and monocyte inflammatory networks in recent-onset schizophrenia patients involves both pro- and anti-inflammatory forces. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011; 14(6):746-755.

Drexhage RC, Knijff EM, Padmos RC, Heul-Nieuwenhuijzen Lv, Beumer W, Versnel MA et al. The mononuclear phagocyte system and its cytokine inflammatory networks in schizophrenia and bipolar disorder. *Expert Rev Neurother*. 2010; 10(1):59-76.

Drexhage RC, van der Heul-Nieuwenhuijsen L, Padmos RC, van Beveren N, Cohen D, Versnel MA, et al. Inflammatory gene expression in monocytes of patients with schizophrenia: overlap and difference with bipolar disorder. A study in naturalistically treated patients. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2010; 13(10):1369-1381.

Enstrom AM, Van de Water JA, Ashwood P. Autoimmunity in autism. *Curr Opin Investig Drugs* 2009; 10:463-473.



Essa MM, Guillemin GJ, Waly MI, Al-Sharbati MM, Al-Farsi YM, Hakkim FL, et al. Increased markers of oxidative stress in autistic children of the Sultanate of Oman. *Biol Trace Elem Res*. 2012; 147(1-3):25-27.

Evans B. How autism became autism: The radical transformation of a central concept of child development in Britain. *Hist Human Sci*. 2013; 26(3):3-31.

Evans TA, Siedlak SL, Lu L, Fu X, Wang Z, McGinnis WR, et al. The autistic phenotype exhibits a remarkably localized modification of brain protein by products of free radical-induced lipid oxidation. *Am J Biochem Biotechnol*. 2008; 4:61-72.

Fatemi SH, Folsom TD, Reutiman TJ, Lee S. Expression of astrocytic markers aquaporin 4 and connexin 43 is altered in brains of subjects with autism. *Synapse*. 2008; 62(7):501-507.

Finegold SM. Therapy and epidemiology of autism-clostridial spores as key elements. *Med Hypotheses*. 2008; 70(3):508-511.

Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, Liu C, Henley KE, Wolcott RD, et al. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe*. 2010;16(4):444-453.

Flora SJ. Metal poisoning: threat and management. *Al Ameen J Med Sci*. 2009; vol. 2:4-26.

Forsythe P, Sudo N, Dinan T, Taylor VH, Bienenstock J. Mood and gut feelings. *Brain Behav Immun*. 2010; 24(1):9-16.

ForTEA MS, Escandell MO, Castro JJ. Estimación de la prevalencia de los trastornos del espectro autista en Canarias. *An Pediatría (Barc)*. 2013; vol.79(6):352-359.

García-Nonell C, Ratera ER, Harris S, Hessel D, Ono MY, Tartaglia N, et al. Secondary medical diagnosis in fragile X syndrome with and without autism spectrum disorder. *Am J Med Genet Part A*. 2008; 146A:1911-1916.

Geier DA, Kern JK, Graver CR, Adams JB. Biomarkers of environmental toxicity and susceptibility in autism. *Neural Sci*. 2008; 6:431-561.

Geier DA, Kern JK, Sykes LK, Geier MR. Mercury-associated diagnoses among children diagnosed with pervasive development disorders. *Metab Brain Dis*. 2018; 33(3):949-960.

Gevi F, Zolla L, Gabriele S, Persico AM. Urinary metabolomics of young Italian autistic children supports abnormal tryptophan and purine metabolism. *Mol Autism*. 2016; 7:47.

Gilbert JA, Krajmalnik-Brown R, Porazinska DL, Weiss SJ, Knight R. Toward effective probiotics for autism and other neurodevelopmental disorders. *Cell*. 2013; 155(7):1446-1448.

Goodman R. The Strengths and Difficulties Questionnaire: a research note. *J Child Psychol Psychiatry*. 1997; 38(5):581-586.

Gupta P, Kar S. Role of ascorbic acid in cadmium-induced thyroid dysfunction with lipid peroxidation in children with autism. *J Appl Toxicol* 1998; 12:317-319.

Hall SS, Lightbody AA, Hirt M, Rezvani A, Reiss AL. Autism in fragile X syndrome: A category mistake? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2010; 49:921-933.

Hall SS, Lightbody AA, Reiss AL. Compulsive, self-injurious, and autistic behavior in children and adolescents with fragile X syndrome. *Am J Ment Retard*. 2008; 113:44-53.

Heijtz RD, Wang S, Farhana AF, Qian Y, Björkholm B, Samuelsson A, et al.

Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(7):3047-3052.

Hernández CJ, Narvaiza JL, Rincón JM, Ruiz I, Sánchez E, Sobradillo B, et al. *Curvas y Tablas de Crecimiento*. Instituto de investigación sobre crecimiento y desarrollo. Madrid: Fundación F. Orbegozo. Ediciones Garsi; 1988.

Hogart A, Wu D, LaSalle JM, Schanen NC. The comorbidity of autism with the genomic disorders of chromosome 15q11.2–q13. *Neurobiol Dis*. 2010; 38:181-191.

Holmes AS, Blaxill MF, Haley BE. Reduced levels of mercury in first baby haircuts of autistic children. *Int J Toxicol*. 2003; 22: 277-85.

Horvath A, Lukasik J, Szajewska H. Omega-3 fatty acid supplementation does not affect autism spectrum disorder in children: a systematic review and meta-analysis. *J Nutr*. 2017; 147(3):367-376.

Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*. 2013; 155(7):1451-1463.

Irwin MR, Wang M, Ribeiro D, Cho HJ, OlmsTEAd R, Breen EC, et al. Sleep loss activates cellular inflammatory signaling. *Biol Psychiatry*. 2008; 64:538-540.

James S, Montgomery P, Williams K. Omega-3 fatty acids supplementation for autism spectrum disorders (ASD) (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2011; 9:CD007992.

Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*. 1943; 217-250.

Kempermann G. Seven principles in the regulation of adult neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 2011; 33(6):1018-1024.

Kern JK, Geier DA, Sykes LK, Geier MR. Evidence of neurodegeneration in autism spectrum disorder. *Transl Neurodegener*. 2013; 2(1):17.

Kern JK, Geier DA, Sykes LK, Haley BE, Geier MR. The relationship between mercury and autism: A comprehensive review and discussion. *J Trace Elem Med Biol*. 2016; 37:8-24.

Kern JK, Geier DA, Sykes LK, Geier MR. Relevance of Neuroinflammation and Encephalitis in Autism. *Front Cell Neurosci*. 2016; 9:519.

Kern JK, Jones AM. Evidence of toxicity, oxidative stress and neuronal insult in autism. *Toxicol Environ Health*. 2006; 9:485-499.

Kwok DK, Chan CH, Soo MT, Lee RS. Low-level chronic mercury exposure in children and adolescents: meta-analysis. *Pediatr Int*. 2007; 49(1):80-87.

Kontush KO, Schekatolina A. Vitamin E in neurodegenerative disorder: Alzheimers disease. *Ann NY Acad*. 2004; 1031:249-262.

Kosinovsky B, Hermon S, Yoran-Hegesh R, Golomb A, Senecky Y, Goetz H, et al. The yield of laboratory investigations in children with infantile autism. *J Neural Transm*. 2005; 112:587-596.

Laurence JA, Fatemi SH. Glial fibrillary acidic protein is elevated in superior frontal, parietal and cerebellar cortices of autistic subjects. *Cerebellum*. 2005; 4:206-210.

Lauritzen L, Brambilla P, Mazzocchi A, Harsløf LB, Ciappolino V, Agostoni C. DHA Effects in Brain Development and Function. *Nutrients*. 2016; 8(1).

Li X, Chauhan A, Sheikh AM, Patil S, Chauhan V, Li XM, et al. Elevated immune response in the brain of autistic patients. *J Neuroimmunol*. 2009; 207(1-2):111-

Lopez-Hurtado E, Prieto JJ. A microscopic study of language-related cortex in autism. *Am J Biochem Biotechnol*. 2008; 4:130-145.

Lonsdale D, Shamberger RJ, Audhya T. Treatment of Autism Spectrum children with thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide: a pilot study. *Neuroendocrinol*. 2002; 23:303-308.

Lord C, Rutter M, DiLavore PC, Risi S, Gotham K, Bishop SL. Autism diagnostic observation schedule (ADOS): Manual. WPS; 2001.

Lovell M, Markesbery W. Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35:7497-7504.

Lussu M, Noto A, Masili A, Rinaldi AC, Dessì A, De Angelis M, et al. The urinary (1) H-NMR metabolomics profile of an Italian autistic children population and their unaffected siblings. *Autism Res*. 2017; 10(6):1058-1066.

Mankad D, Dupuis A, Smile S, Roberts W, Brian J, Lui T, et al. A randomized, placebo controlled trial of omega-3 fatty acids in the treatment of young children with autism. *Mol Autism*. 2015; 6:18.

Mattson M, Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7:278-294.

Mavel S, Nadal-Desbarats L, Blasco H, Bonnet-Brilhault F, Barthélémy C, Montigny F, et al. <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C NMR-based urine metabolic profiling in autism spectrum disorders. *Talanta*. 2013; 114:95-102.

McInnes LA, Gonzalez PJ, Manghi ER, Esquivel M, Monge S, Delgado MF, et al. A genetic study of autism in Costa Rica: Multiple variables affecting IQ scores observed in a preliminary sample of autistic cases. *BMC Psychiatry*. 2005; 5:15.

Mendlewicz J, Kriwin P, Oswald P, Souery D, Alboni S, Brunello N. Shortened onset of action of antidepressants in major depression using acetylsalicylic acid augmentation: A pilot open-label study. *Int Clin Psychopharmacol*. 2006; 21:227-231.

Meyers CA, Albitar M, Estey E. Cognitive impairment, fatigue, and cytokine levels in patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 2005; 104:788-793.

Miller A, Maletic V, Raison C. Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. *Biol Psychiatry*. 2009; 65:732-741.

Miller BJ, Culpepper N, Rapaport MH, Buckley P. Prenatal inflammation and neurodevelopment in schizophrenia: a review of human studies. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013; 42:92-100.

Ming X, Stein TP, Barnes V, Rhodes N, Guo L. Metabolic perturbation in autism spectrum disorders: a metabolomics study. *J Proteome Res*. 2012; 11(12):5856-5862.

Ming X, Stein TP, Brimacombe M, Johnson WG, Lamber GH, Wagner GC. Increased excretion of a lipid peroxidation biomarker in autism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005; 73:379-84.

Molloy CA, Morrow AL, Meinzen-Derr J, Schleifer K, Dienger K, Manning-Courtney P, et al. Elevated cytokine levels in children with autism spectrum disorder. *J Neuroimmunol*. 2006; 172(1-2):198-205.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19:683-765.

Morgan JT, Chana G, Pardo CA, Achim C, Semendeferi K, Buckwalter J, et al.

Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Biol Psychiatry*. 2010; 68(4):368-376.

Mostafa GA, El-Hadidi ES, Hewedi DH, Abdou MM. Oxidative stress in Egyptian children with autism: relation to autoimmunity. *J Neuroimmunol*. 2010; 219(1-2):114-118.

Mostafa GA, Kitchener N. Serum anti-nuclear antibodies as a marker of autoimmunity in Egyptian autistic children. *Pediatr Neurol*. 2009; 40:107-112.

Motivala SJ, Sarfatti A, Olmos L, Irwin MR. Inflammatory markers and sleep disturbance in major depression. *Psychosom Med*. 2005; 67:187-194.

Muller N, Schwarz MJ, Dehning S, Douhe A, Cerovecki A, Goldstein-Muller B, et al. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: Results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine. *Mol Psychiatry*. 2006; 11:680-684.

Mussap M, Noto A, Fanos V. Metabolomics of autism spectrum disorders: early insights regarding mammalian-microbial cometabolites. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016; 16(8):869-881.

Nadal-Desbarats L, Aïdoud N, Emond P, Blasco H, Filipiak I, Sarda P, et al. Combined <sup>1</sup>H-NMR and <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC-NMR to improve urinary screening in autism spectrum disorders. *Analyst*. 2014; 139(13):3460-3468.

Naik US, Gangadharan C, Abbagani K, Nagalla B, Dasari N, Manna SK. A study of nuclear transcription factor-kappa B in childhood autism. *PLoS One*. 2011; 9:6(5).

Napoli E, Wong S, Giulivi C. Evidence of reactive oxygen species-mediated damage to mitochondrial DNA in children with typical autism. *Mol Autism*. 2013; 4(1):2.

Nelson KB, Bauman ML. Thimerosal and autism? *Pediatrics*. 2003; 111:674-679.

Nikam S, Nikam P, Ahaley S, Sontakke A. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Indian J Clin Biochem*. 2009; 24:98-101.

Noto A, Fanos V, Barberini L, Grapov D, Fattuoni C, Zaffanello M, et al. The urinary metabolomics profile of an Italian autistic children population and their unaffected siblings. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014; 27 Suppl 2:46-52.

OMS. CIE-10. The ICD Classification of Mental and Behavioural Disorders: Diagnostic criteria for research. 10<sup>a</sup> Rev. Madrid: Meditor; 1992.

Padayatty S, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr*. 2003; 22:18-35.

Padmos RC, Hillegers MH, Knijff EM, Vonk R, Bouvy A, Staal FJ, et al. A discriminating messenger RNA signature for bipolar disorder formed by an aberrant expression of inflammatory genes in monocytes. *Arch Gen Psychiatry*. 2008; 65(4):395-407.

Pardo CA, Vargas DL, Zimmerman AW. Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. *Int Rev Psychiatry*. 2005; 17(6):485-495.

Parletta N, Milte CM, Meyer BJ. Nutritional modulation of cognitive function and mental health. *J Nutr Biochem*. 2013; 24(5):725-743.

Parletta N, Niyonsenga T, Duff J. Omega-3 and Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acid Levels and Correlations with Symptoms in Children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder, Autistic Spectrum Disorder and Typically Developing Controls. *PLoS One*. 2016; 11(5).

Persico AM, Napolioni V. Urinary p-cresol in autism spectrum disorder.



Neurotoxicol Teratol. 2013; 36:82-90.

Posada-De la Paz M, Ferrari-Arroyo MJ, Touriño E, Boada L. Investigación epidemiológica en el autismo: una visión integradora. Rev Neurología. 2005; 40 (Supl):191-198.

Raison CL, Capuron L, Miller AH. Cytokines sing the blues: Inflammation and the pathogenesis of major depression. Trend Immunol. 2006; 27:24-31.

Reddy KS. Cytogenetic abnormalities and fragile-X syndrome in Autism spectrum disorder. BMC Med Genet. 2005; 6:3.

Reichenberg A, Yirmiya R, Schuld A, Kraus T, Haack M, Morag A, et al. Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. Arch Gen Psychiatry. 2001; 58:445-452.

Roberts JE, Weisenfeld LA, Hatton DD, Heath M, Kaufmann WE. Social approach and autistic behavior in children with fragile X syndrome. J Autism Dev Disord. 2007; 37:1748-1760.

Rodriguez JI, Kem JK. Evidence of microglial activation in autism and possible role in brain underconnectivity. Neuron Glia Biology. 2011; 7:205-213.

Sahoo T, Peters SU, Madduri NS, Glaze DG, German JR, Bird LM, et al. Microarray based comparative genomic hybridization testing in deletion bearing patients with Angelman syndrome: Genotype-phenotype correlations. J Med Genet. 2006; 43:512-516.

Sajdel-Sulkowska EM, Lipinsk B, Windom H, Audhya T, McGinnis W. Oxidative stress in autism: elevated cerebellar 3-nitrotyrosine levels. Am J Biochem Biotechnol. 2008; 4:73-84.

Sajdel-Sulkowska EM, Xu M, Koibuchi N. Increase in cerebellar neurotrophin-3 and oxidative stress markers in autism. Cerebellum. 2009; 8:366-372.

Sajdel-Sulkowska EM, Xu M, McGinnis W, Koibuchi N. Brain region-specific changes in oxidative stress and neurotrophin levels in autism spectrum disorders (ASD). *Cerebellum*. 2011; 10:43-48.

Scholper E, Van Bourgondien ME, Wellman GJ, Love SR. Childhood Autism Rating Scale-(CARS2). Los Angeles, CA: Western Psychological Services; 2010.

Schuchardt JP, Huss M, Stauss-Grabo M, Hahn A. Significance of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for the development and behaviour of children. *Eur J Pediatr*. 2010; 169(2):149-164.

Sen CK, Khanna N, Rin CC, Roy S. Tocotrienols: the emerging face of natural vitamin E. *Vitam Horm*. 2007; 76:203–261.

Sogut S, Zoroglu SS, Ozyurt H, Ramazan YH, Ozugurlu F, Sivash E, et al. Changes in nitric oxide levels and antioxidant enzyme activities may have a role in the pathophysiological mechanisms involved in autism. *Clin Chim Acta*. 2003; 331:111-117.

Stepanova E, Dowling S, Phelps M, Findling RL. Pharmacotherapy of emotional and behavioral symptoms associated with autism spectrum disorder in children and adolescents. *Dialogues Clin Neurosci*. 2017; 19(4):395-402.

Sun X, Allison C, Matthews FE, Sharp SJ, Auyeung B, Baron-Cohen S, et al. Prevalence of autism in mainland China, Hong Kong and Taiwan: a systematic review and meta-analysis. *Mol Autism*. 2013; 4(1):7.

Suvisaari J, Mantere O. Inflammation theories in psychotic disorders: a critical review. *Infect Disord Drug Targets*. 2013; 13(1):59-70.

Tachibana Y, Miyazaki C, Ota E, Mori R, Hwang Y, Kobayashi E, et al. A systematic review and meta-analysis of comprehensive interventions for pre-

school children with autism spectrum disorder (ASD). PLoS One. 2017;12(12).

Taylor B, Jick H, Maclaughlin D. Prevalence and incidence rates of autism in the UK: time trend from 2004-2010 in children aged 8 years. BMJ Open. 2013; 3(10).

Terracciano A, Chiurazzi P, Neri G. Fragile X syndrome. Am J Med Genet Part C. 2005; 137C:32-37.

Universidad de Córdoba. Córdoba [Internet]. Consultado en 2012. Peña. No disponible. <http://Inmunologíaenlinea.es>

Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. Ann Neurol. 2005; 57(1):67-81.

Voigt RG, Mellon MW, Katusic SK, Weaver AL, Matern D, Mellon B, et al. Dietary docosahexaenoic acid supplementation in children with autism. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2014; 58(6):715-22.

Vojdani A, Bock K, Hirani AK. Low natural killer cell cytotoxic activity in autism: the role of glutathion, IL-2 and IL-15. J Neuroimmunol. 2008; 205:148-154.

Wecker L, Miller SB, Cochran SR. Trace element concentrations in hair from autistic children. J Ment Defic Res. 1985; 29:15-22.

West PR, Amaral DG, Bais P, Smith AM, Egnash LA, Ross ME, et al. Metabolomics as a tool for discovery of biomarkers of autism spectrum disorder in the blood plasma of children. PLoS One. 2014; 9(11).

Wills S, Cabanlit M, Bennett J, Ashwood P, Amaral D, Van de Water J. Autoantibodies in autism spectrum disorders (ASD). Ann N Y Acad Sci. 2007; 1107:79-91.

Yap IK, Angley M, Veselkov KA, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. Urinary metabolic phenotyping differentiates children with autism from their unaffected siblings and age-matched controls. *J Proteome Res.* 2010; 9(6):2996-3004.

Yao UK, Reddy RD, Van DP. Oxidative damage and schizophrenia: an overview of the evidence and its therapeutic implications. *CNS Drugs.* 2001; 15:237-310.

Yorbik O, Sayal A, Akay C, Akbiyik DI, Sohmen T. Investigation of antioxidant enzymes in children with autistic disorder. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002; 67(5):341-343.

Young AM, Campbell E, Lynch S, Suckling J, Powis SJ. Aberrant NF-kappaB expression in autism spectrum condition: a mechanism for neuroinflammation. *Front Psychiatry.* 2011; 2:27.

Yui K, Koshiba M, Nakamura S, Kobayashi Y. Effects of large doses of arachidonic acid added to docosahexaenoic acid on social impairment in individuals with autism spectrum disorders: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *J Clin Psychopharmacol.* 2012; 32(2):200-206.

Zafeiriou DI, Ververi A, Dafoulis V, Kalyva E, Vargiami E. Autism Spectrum Disorders: The Quest for Genetic Syndromes. *Am J Med Genet Part B.* 2013; 162B:327-366.

Zhang, X. Y, Zhou D. F, Cao L. Y, Zhang P. Y, Shen Y. C. Changes in serum interleukin-2, -6, and -8 levels before and during treatment with risperidone and haloperidol: relationship to outcome in schizophrenia. *J. Clin. Psychiatry.* 2004; 65:940-947.

Zhou C, Huang Y, Przedborski S. Oxidative stress in Parkinson's disease. A mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1147:104.

Zingg JM, Azzi A. Non-antioxidant activities of vitamin E. *Curr Chem Med.* 2004;

11:1113-1133.

Zoroglu SS, Armutcu F, Ozen S, Gurel A, Sivasli E, Yetkin O, et al. Increased oxidative stress and altered activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes in autism. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2004; 254:143-147.

## 6 ANEXOS

**Anexo 1: Artículo:** Gomez-Fernández A, de la Torre-Aguilar MJ, Gil-Campos M, Flores-Rojas K, Cruz-Rico MD, Martin-Borreguero P, Perez-Navero JL. Children With Autism Spectrum Disorder With Regression Exhibit a Different Profile in Plasma Cytokines and Adhesion Molecules Compared to Children Without Such Regression. **Front Pediatr.** 2018 Sep 26;6:264. doi: 10.3389/fped.2018.00264. eCollection 2018. PMID: 30320048

**Anexo 2: Artículo:** Plaza-Díaz J <sup>1†</sup>, Gómez-Fernández A <sup>1†</sup> Chueca N, Torre-Aguilar MJ, Gil Á, Perez-Navero JL, Flores-Rojas K, Martín-Borreguero P, Solis-Urra P, Ruiz-Ojeda FJ, Garcia F, Gil-Campos M. Autism Spectrum Disorder (ASD) with and without Mental Regression is Associated with Changes in the Fecal Microbiota. **Nutrients.** 2019 Feb 5;11(2). pii: E337. doi: 10.3390/nu11020337. PMID: 30764497

**Anexo 3: Artículo :**Rangel-Huerta OD <sup>1†</sup>, Gomez-Fernández A <sup>1†</sup>, de la Torre-Aguilar MJ, Gil A, Perez-Navero JL, Flores-Rojas K, Martín-Borreguero P, Gil-Campos M. Metabolic profiling in children with autism spectrum disorder with and without mental regression: preliminary results from a cross-sectional case-control study. **Metabolomics.** 2019 Jun 27;15(7):99. doi: 10.1007/s11306-019-1562-x. PMID: 31250215

**Anexo 4: Ficha técnica de Eupoly-3® DHA Infant, administrado a los niños con TEA seleccionados en este estudio.** Es un aceite de atún purificado, refinado, desodorizado y estabilizado, rico en ácido docosahexaenoico (DHA). Este producto se utiliza en la elaboración de fórmulas infantiles. Cumple con los niveles más estrictos de todos los contaminantes posibles, y su administración es microencapsulada.



# Children With Autism Spectrum Disorder With Regression Exhibit a Different Profile in Plasma Cytokines and Adhesion Molecules Compared to Children Without Such Regression

Antonio Gomez-Fernandez<sup>1</sup>, Maria J. de la Torre-Aguilar<sup>1</sup>, Mercedes Gil-Campos<sup>2\*</sup>, Katherine Flores-Rojas<sup>2</sup>, Maria D. Cruz-Rico<sup>3</sup>, Pilar Martin-Borreguero<sup>4</sup> and Juan Luis Perez-Navero<sup>1</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Paolo Curatolo,  
Università degli Studi di Roma Tor  
Vergata, Italy

### Reviewed by:

Leonardo Emberti Gialloreti,  
Università degli Studi di Roma Tor  
Vergata, Italy  
Romina Moavero,  
Bambino Gesù Ospedale Pediatrico  
(IRCCS), Italy

### \*Correspondence:

Mercedes Gil-Campos  
mercedes\_gil\_campos@yahoo.es

### Specialty section:

This article was submitted to  
Pediatric Neurology,  
a section of the journal  
Frontiers in Pediatrics

**Received:** 03 July 2018

**Accepted:** 05 September 2018

**Published:** 26 September 2018

### Citation:

Gomez-Fernandez A,  
de la Torre-Aguilar MJ, Gil-Campos M,  
Flores-Rojas K, Cruz-Rico MD,  
Martin-Borreguero P and  
Perez-Navero JL (2018) Children With  
Autism Spectrum Disorder With  
Regression Exhibit a Different Profile in  
Plasma Cytokines and Adhesion  
Molecules Compared to Children  
Without Such Regression.  
Front. Pediatr. 6:264.  
doi: 10.3389/fped.2018.00264

<sup>1</sup> Department of Pediatrics, Reina Sofia University Hospital, University of Córdoba, Maimónides Institute for Biomedical Research of Córdoba (IMIBIC), Córdoba, Spain, <sup>2</sup> Pediatric Metabolism Unit, Reina Sofia University Hospital, Maimónides Institute for Biomedical Research of Córdoba (IMIBIC), University of Córdoba, Centro de Investigación Biomédica en Red-Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Córdoba, Spain, <sup>3</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology II, Institute of Nutrition and Food Technology, Center of Biomedical Research, University of Granada, Granada, Spain, <sup>4</sup> Department of Child and Adolescent Clinical Psychiatry and Psychology, Reina Sofia University Hospital, Maimónides Institute for Biomedical Research of Córdoba (IMIBIC), Córdoba, Spain

**Background:** In the etiopathogenesis of autism spectrum disorder (ASD), it has been suggested that a proinflammatory condition, as well as an alteration in adhesion molecules in the early stages of neurodevelopment, may play a role in the pathophysiology of the disorder. This study set out to evaluate the plasma levels of certain inflammatory cytokines, adhesion molecules, and growth factors in a sample of pediatric patients with ASD and compare them to the levels in a control group of healthy children.

**Methods:** Fifty-four children (45 males and nine females) aged 2-6, who were diagnosed with ASD, and a control group of 54 typically-developing children of similar ages were selected. The diagnosis of ASD was carried out in accordance with the DSM-5 criteria and the data obtained from a developmental semi-structured clinical interview and the ADOS evaluation test. Additional testing was carried out to identify the children's developmental level and severity of ASD symptomatology. Patients with ASD were further divided into two subgroups based on developmental parameters: ASD children with neurodevelopmental regression (AMR) and ASD children without neurodevelopmental regression (ANMR). Analyses of plasma molecules, such as cathepsin, IL1 $\beta$ , IL6, IL8, MPO, RANTES, MCP, BDNF, PAI NCAM, sICAM, sVCAM and NGF, were performed.

**Results:** Higher levels of NGF were observed in the ASD group compared with the levels in the control group ( $p < 0.05$ ). However, in the analysis of the ASD subgroups, lower plasma levels of NCAM and higher levels of NGF were found in the group of ASD children without developmental regression compared to the levels in the group of typically-developing children.

**Conclusions:** These results suggest differences that could be related to different pathophysiological mechanisms in ASD. There is not a specific profile for the expression of relevant plasma cytokines, adhesion molecules or growth factors in children with ASD compared with that in typically-developing children. However, in the ANMR and AMR subgroups, some of the adhesion molecules and neuronal growth factors show differences that may be related to synaptogenesis.

**Keywords:** autism spectrum disorder, cell adhesion molecules, children, cytokines, neurodevelopmental regression

## INTRODUCTION

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder that is characterized by persistent deficits in social communication and social interaction across multiple contexts and by the presence of repetitive and restricted patterns of behaviors, activities, and interests. These deficits are present from early childhood, although some difficulties may not manifest themselves until the demands of the environment exceed the capacity of the child (1). ASD mainly affects males, by a ratio of 4:1 (2), and is generally detected in the second year of life.

It is well established that children with ASD do not constitute a homogeneous clinical group, and many different pathologies show a similar constellation of behavioral symptoms that converge within ASD. The existence of developmental regression in some children with ASD has been corroborated by multiple studies (3). Children with ASD who lose skills belong to a subgroup designated with the term “regressive autism.” Regressive autism usually refers to a child whose parents report an early history of normal development for 12–24 months, followed by a loss of previously acquired skills. Language regression is the most obvious form of regression, but regressive autism can also be accompanied by more global regression involving loss of social attention, social skills and social interest (4).

Knowledge about the etiology and neuropathology of ASD remains elusive however, and no biological markers have been found. Most studies concur that there has been a significant increase in the prevalence of autism, affecting approximately 0.75–1.55% of the pediatric population (5, 6). It has recently been reported that the prevalence of ASD reaches nearly 3% in some communities in the United States, representing an increase of 150% since 2000 (7).

Various studies published in recent years have supported the idea that a proinflammatory situation may play a role in the pathophysiology of ASD (8). An increase in proinflammatory

cytokines has been reported in samples of post-mortem brain tissue and cerebrospinal fluid, plasma, and mononuclear cell cultures (9, 10). Levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukins 6 and 8 (IL-6, IL-8), monocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) have also been reported as being higher in the brains of patients with ASD than in the brains of the healthy population (11). The increase in cytokines may indicate an impaired immune response, with a predominant response of Th2 cells. Some authors have suggested the existence of an endophenotype of ASD linked to an autoimmune dysregulation (12). Others (13, 14) have described altered levels of immune mediators linked to greater deterioration in behavior. It has thus been suggested that a dysregulation of the immune response may be related to the behavior and cognitive impairment of children with ASD.

Chemokines and their receptors have been implicated in the circulation and movement of mononuclear cells in the CNS, mediating the recruitment of myeloid cells into areas of damage and inflammation. Increased levels of various chemokines (macrophage inflammatory proteins [MIP-1B], regulated on activation, normal T cell expressed and secreted [RANTES], monocyte Chemoattractant protein-1 [MCP-1]) have been reported in astrocytes in the cerebellum and brain tissue, as well as in peripheral blood in children with ASD. They have been linked to a deterioration in communication skills, stereotyped behaviors and hyperactivity, and an impairment of cognitive functions and adaptive skills (15, 16). The cell adhesion molecule is an Ig superfamily adhesion molecule (CAM) with an established role in axon growth and repulsion. Serum samples have been reported to exhibit a decrease in the levels of vascular and intercellular cell adhesion molecules, notably sPECAM-1 (soluble platelet-endothelial cell adhesion molecule-1) and sVCAM-1 (soluble vascular cell adhesion molecule-1), which can also play a role in the development of ASD (17).

Multiple hypotheses have been put forward to account for the etiopathogenesis and developmental trajectories of ASD. The roles of cytokines, adhesion molecules and growth factors have not been clarified precisely in this regard, but they may have an adverse bearing on the establishment of neuronal synapses and their functioning in a situation of greater synaptic plasticity. The goal of the present study was therefore to analyze the plasma levels of some relevant molecules in children with ASD and to compare these to the values exhibited by a group of typically-developing children. The study also focused on the possible relationships between the levels of such cytokines and the

**Abbreviations:** ASD, Autism Spectrum Disorder; AMR, mental regression group; ANMR, non-mental regression group; BDNF, brain derived neurotrophic factor; BMI, Body mass index; CARS, Childhood Autism Rating Scale Test; C-CRP, C-reactive protein HGF, hepatocyte growth factor; ICAM, intercellular adhesion molecule; IL, interleukin; MCP-1, monocyte chemotactic protein; MPO, myeloperoxidase; NCAM, neuronal cell adhesion molecules; NGF, nerve growth factor; PAI, plasminogen activator factor; PDDBI, PDD Behavior Inventory; RANTES, regulated on activation normal t cell expressed and secreted; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ; VCAM, vascular cell adhesion molecules.



clinical severity of ASD core symptomatology and the regression phenotype in ASD.

## MATERIALS AND METHODS

This observational case-control study was approved by the Clinical Research and Bioethics Committee at the authors' hospital and was conducted in full compliance with the fundamental principles established in the Declaration of Helsinki. The data relating to the ASD patients were collected at the time they were recruited into the study. The selected subjects were incorporated into the study after all the criteria for inclusion were fulfilled, and informed written consent was obtained from the children's legal guardians.

### Subjects

The patients with ASD were recruited from the Department of Child and Adolescent Clinical Psychiatry and Psychology at the authors' hospital. Some of the patients (aged 2–3) were recruited at the time of their ASD diagnosis, whereas the older patients (aged 3–6) were selected from among those who had already been diagnosed at the same unit. The control group comprised children diagnosed with phimosis and hernias, lacking any other pathology, who attended preoperative anesthesia consultations prior to surgical corrections. None of the controls belonged to the same families as the ASD cases.

The diagnosis of ASD was based on the clinical judgment of professionals specialized in the identification of the unique developmental profile of subjects with ASD. The diagnostic decision was based on the information obtained from semi-structured clinical development interviews and psychological and behavioral tests internationally recognized as reliable and valid for this purpose. In this study, two clinical psychologists, a psychiatrist and an occupational therapist with extensive clinical experience and training in diagnostic tests for research in ASD performed the diagnosis using the criteria established by DSM-5 (1). Two specialized pediatricians reviewed the medical histories of the children and performed examinations of all the children.

Inclusion criteria: the ASD children were 2–6 years old with a clinical diagnosis confirmed by validated scores. Additionally, a control group of typically-developing children was selected and matched to the ASD group by gender and age. A physical examination, assessing neurological development and a blood analysis were performed to confirm that they were healthy children.

Any children with ASD presenting other neurological, metabolic or genetic diagnoses were excluded, as were children receiving medical treatment for autism-related behavioral comorbidities. The group of ASD children was further divided into two subgroups based on the presence or absence of neurodevelopmental regression during the first two years of life, which was assessed using a five-item questionnaire following the guidelines used by the Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) for the evaluation of this process (18). The ASD children who obtained a score equal to or  $>3$  were included in the neurodevelopmental regression ASD group (AMR), and

those with a score of less than 3 were included in the non-neurodevelopmental regression ASD group (ANMR). The ASD group was also classified according to whether children presented neurodevelopmental delay (i.e., a score lower than 70 in the cognitive quotient of the Battelle developmental test).

### Standardized Diagnostic Measurements and Assessments of ASD Severity

All the children with ASD underwent an initial developmental clinical interview, which identified the core symptomatology of ASD according to DSM-5 clinical diagnostic criteria. Additionally, the following tests were administered to all the children:

- a) **Autism Diagnostic Observation Schedule-2 (ADOS-2)** (19). This is a standardized and semi-structured assessment scale designed to measure communication, social interaction, play, and the imaginative use of materials. The children were given an ADOS module consistent with their language development and age. This was administered by two clinical psychologists with official formal training in the administration and quantitative interpretation of the test for research purposes. All children with ASD in the study exceeded the cut-off point for the diagnosis of ASD.
- b) **Pervasive Developmental Disorders Behavior Inventory Parent Ratings (PDDBI)**, standardized version for the Spanish-speaking European population. (20) This test was used to evaluate the symptomatic severity of pervasive developmental disorders in ASD patients aged from 2 to 6 years. This test, which was administered to all the parents (not teachers) of the children with ASD, evaluates the characteristic ASD core behavioral deficit (deficits in social interaction, language and pragmatic communication and stereotyped behavior), additional behavioral difficulties (fears, aggressive behaviors), and adaptive behaviors (scales of the children's social, linguistic, and learning skills). All the children with ASD in the study obtained a score  $\geq 30$ .
- c) **Childhood Autism Rating Scale Test (CARS-2)** (21). This scale was used for the quantification of the severity of autism pathology: mild, moderate or severe.
- d) **Battelle Developmental Inventory, Second Edition (BDI-2)** (22). This test assesses the child's current level of development and functioning in five areas (i.e., personal/social, adaptive, motor, communication, and cognitive areas).
- e) **Strengths and Difficulties Questionnaire (SDQ)** (23): Two to four years. This questionnaire was used to assess the presence of behavioral difficulties, as well as adaptive behaviors.

### Clinical Evaluation

A thorough developmental clinical history, including major childhood illnesses and immunisations, was taken. A physical examination was also conducted with a special emphasis on neurological and nutritional status. Anthropometric measurements (weight, height and body mass index) were obtained using standard techniques, and validated nutritional questionnaires were also administered.

## Biochemical Analysis

After overnight fasting, blood samples were collected from the children with ASD and the healthy controls from the antecubital vein into 6-ml blood collection tubes containing EDTA. After centrifugation at 3,500 g for 10 min, plasma was divided into aliquots and processed within 2 h from sampling, and then frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Blood count and a general biochemical analysis were performed to confirm the absence of other diseases. C-reactive protein (C-CRP) (mg/l) was also measured as an inflammatory marker. These analyses were performed in the hospital laboratory using colorimetric, enzymatic, kinetic, indirect potentiometry, or immunoturbidimetric methods previously standardized, using an automatic autoanalyzer (Roche-Hitachi Modular PYD autoanalyzer, Roch Laboratory Systems, Mannheim, Germany).

In the light of observations made in the existing literature (24, 25), molecules that have previously been linked to autism were selected for plasma analysis: IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8, MCP-1, TNF- $\alpha$ , myeloperoxidase (MPO), RANTES, cathepsin D, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), hepatocyte growth factor (HGF), nerve growth factor (NGF), plasminogen activator factor (PAI) and cell adhesion molecule (NCAM, sICAM, VCAM).

These biomarkers were analyzed through simultaneous detection of multi-analytes using LINCoplex assay kits and Luminex xMAP Detection Technology. The sensitivity of this assay enabled the detection of chemokine concentrations to the following concentrations: IL-1 $\beta$ , 0.4183 pg/ml; IL-6, 0.2 pg/ml; IL-8, 0.3 pg/ml; MCP-1, 2 pg/ml; TNF- $\alpha$ , 0.3 pg/ml; MPO, 20 ug/L; cathepsin D, 8.06 ug/L; RANTES: 12 ug/L; BDNF, 0.23 ug/L; HGF, 4 pg/ml; NGF, 0.3 pg/ml; plasminogen activator factor (PAI), 0.48 ug/L; NCAM, 4.81 ug/L; sICAM-1, 6.29 ug/L, and sVCAM, 6.44 ug/L).

## Statistical Analysis

With regard to the size of the ASD sample used in this study, given that the prevalence of ASD in Spain is calculated at 1% (5), 50 patients with ASD needed to be recruited for the study, taking into account a 5% margin of errors and a 95% confidence interval. The sample size for this study was calculated based on the most relevant inflammatory parameters using published data results (16), choosing the one that required a larger sample size (RANTES). Accepting alpha errors of 0.05 and beta errors of 0.2 in a bilateral contrast, 54 subjects per group were required to detect a difference equal to or  $>400$  pg/ml. The standard deviation was assumed to be 720.

The values of the molecules that were not detected were considered to be lost values, and the statistical study was performed on the remaining values. The data are expressed as mean  $\pm$  SD (95% confidence intervals), median (IQR) or absolute (relative frequencies). The Shapiro–Wilk test was used for typically distributed data. Homogeneity of variances was estimated using Levene's test. The mean values for typically-distributed continuous variables among groups were compared using the unpaired Student's *t*-test. The Mann–Whitney *U*-test was used for asymmetrically distributed data. Bonferroni correction was used for multiple comparisons to avoid chance.

Categorical variables were assessed using the  $\chi^2$ -test or the Fisher exact test.

Comparisons between subgroups of ASD and with the control group were performed using ANOVA, with the Sidak correction for post hoc comparisons. Correlations between the biomarker levels and the scores resulting from the various tests carried out were performed using Spearman's  $\rho$  (rho). All the tests were two-tailed, and a *P*-value  $<0.05$  was considered to be statistically significant. The data were analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS for Windows, release 18.0.0 2010, SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

## RESULTS

Initially, 57 ASD children were selected for this study. Of these, three children were later excluded for not meeting the diagnostic criteria for ASD during the subsequent follow-up interviews at 30 months. The clinical and psychological characteristics of the ASD patients, the subgroup with neurodevelopmental regression (AMR) and subgroup without neurodevelopmental regression (ANMR) and the typically-developing controls are shown in **Table 1**. Within the ASD group, there were 20 children included in the AMR subgroup and 32 in the ANMR subgroup; two children could not be classified in these subgroups because they were adoptees, allocated by a national adoption agency. Clinical differences between these two ASD subgroups were reflected in the different behavioral tests scores obtained. All the children obtained scores above the ASD cut-off point in the ADOS-2 test. However, the patients in the AMR subgroup obtained lower scores in the Battelle developmental test than those in the ANMR subgroup, as well as higher scores in the CARS-2 test and total autism severity score in the PDBB test (**Table 1**).

All the proinflammatory biomarkers were detected in the plasma samples of more than 50% of the children with ASD, except for IL1 $\beta$ , which was detected in the plasma of only 16% of children with ASD and 6% of typically-developing children ( $\chi^2$ : 2.7; *p*: 0.141), and NGF, which was detected in 37% of children with ASD and 27% of the control children ( $\chi^2$ : 1.77; *p*: 0.183). No differences were found between the two groups in terms of the cytokine and adhesion molecule levels studied, except for NGF, in which the group of ASD children was found to have twice the plasma levels compared to the control group (**Table 2**).

Within the ASD group, the ANMR subgroup had lower NCAM plasma levels than both the AMR subgroup and typically-developing children, and higher NGF levels than the typically-developing children in the control group (**Figure 1**). There was no association between NCAM and NGF levels in any of the groups. There was no correlation between the levels of NCAM and NGF in either ASD subgroup, whether AMR or ANMR. No differences were identified in the levels of the molecules when comparing ASD subgroups either between high and low-functioning ASD children (in accordance with the cognitive scores from the Battelle test), or between female and male ASD children (results not shown).

**TABLE 1 |** Demographic and anthropometric data in children with autism spectrum disorders (ASD) compared to controls.

	ASD			CONTROL	P
	Total	AMR	ANMR		
Age (months)	43.76 ± 11.2 43.5 (33–52.5)	43.74 ± 11.9 44 (32–52.5)	43.64 ± 10.7 43 (35.5–52)	48.81 ± 18.33 51 (31–60)	ns
Gender (male)	45 (83%)	17 (85%)	27 (82%)	46 (84%)	ns
Weight (kg)	16.97 ± 3.51	17.28 ± 4.17	16.65 ± 3.08	17.06 ± 4.5	ns
Height (cm)	102.7 ± 8.3	101.9 ± 8.3	102.9 ± 8.3	101.96 ± 11.1	ns
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	15.94 ± 1.71	16.4 ± 1.67	15.67 ± 1.73	16.16 ± 1.74	ns
Battelle test	55.69 ± 13.8	47.05 ± 10.33	60.96 ± 13.29		0.002*
CARS test	32.6 ± 7.29	35.9 ± 8.12	30.6 ± 6.11		0.009*
PDBBI test	48.86 ± 10.82	53.93 ± 10.39	46.13 ± 10.47		0.023*

ASD, autism spectrum disorders; AMR, mental regression group; ANMR, non-mental regression group; BMI, body mass index; CARS, Childhood Autism Rating Scale Test; PDBBI, PDD Behavior Inventory. ns, no significant difference between ASD vs. control and AMR and ANMR. P\* value between AMR vs. ANMR. Data are given as the mean ± standard deviation and median (interquartile range). P-values were obtained from the Mann-Whitney U-test, Student's T test, or the Fisher exact test, as appropriate. P value ASD P < 0.05 value was considered to be statistically significant.

**TABLE 2 |** Plasma cytokine levels in patients with childhood autism (ASD) compared to the levels in the healthy control group.

Biochemical biomarkers	n	ASD	n	Control	p
C-CRP (mg/L)	54	1.9 ± 4.7	54	2.09 ± 5.09	0.77
Cathepsin D (ug/L)	54	119.5 (81.07–165.4)	54	107.2 (79.1–165.5)	0.874
IL1β (pg/ml) <sup>a</sup>	9	1.08 (0.6–3.07)	4	2.16 (1.2–4.24)	0.825
IL6 (pg/ml)	44	1.38 (0.34–2.98)	54	0.7 (0.24–1.46)	0.148
IL8 (pg/ml)	52	1.84 (0.84–3.82)	54	1.34 (0.67–2.77)	0.171
TNFα (pg/ml)	54	3.16 (2.2–4.56)	54	2.66 (1.83–3.69)	0.07
MPO (ug/L)	53	80.03 (54.96–148.5)	54	88.2 (61.4–141.5)	0.551
MCP-1 (pg/ml)	54	122.46 (100.8–156.32)	54	117.13 (98.2–141.51)	0.228
RANTES (ug/L)	54	70.97 (41.47–135.8)	54	59.75 (28.95–94.92)	0.175
PAI (ug/L)	54	70.07 (45.52–92.65)	54	62.91 (40.62–111.53)	0.766
NCAM (ug/L)	54	392.20 ± 73.567	54	410.13 ± 72.68	0.196
ICAM (ug/L)	54	173.1 (148.85–189.9)	54	159.9 (143.2–188.6)	0.166
VCAM (ug/L)	54	1083.7 (903.8–1216.8)	54	1047.6 (840.2–1162.48)	0.283
HGF (pg/ml)	54	162.7 (136.1–222.3)	54	163.17 (131.07–194.36)	0.514
BDNF (ug/L)	54	5.04 (2.95–7.62)	54	5.36 (3.48–10.19)	0.825
NGF (pg/ml)	21	4.78 (2.93–13.18)	16	2.06 (1.25–7.36)	<b>0.05</b>

BDNF, brain-derived neurotrophic factor; C-CRP, C-reactive protein; HGF, hepatocyte growth factor; ICAM, intercellular adhesion molecule; IL, interleukin; MCP-1, monocyte chemotactic protein; MPO, myeloperoxidase; NCAM, neuronal cell adhesion molecule; NGF, nerve growth factor; PAI, plasminogen activator factor; RANTES, regulated on activation normal T cell expressed and secreted; TNFα, tumor necrosis factor α; VCAM, vascular cell adhesion molecule.

Data are given as the mean ± SD or median values interquartile range. P-values were obtained from the Mann-Whitney U-test or Student's T-test, as appropriate using Bonferroni correction. P < 0.05 was considered to be statistically significant. P-values in bold are statistically significant.

Associations between plasma chemokine levels and clinical behavioral and developmental outcomes were studied. Only correlations with  $r > 0.3$  are shown in **Table 3**. No associations between the scores obtained in behavioral and developmental tests and the cytokines in the ASD group were observed. However, within the ASD group, the

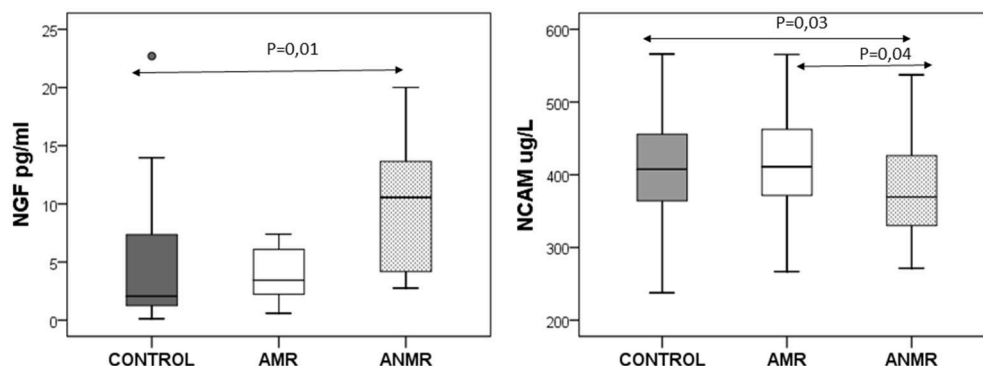
ANMR subgroup exhibited a negative correlation between ICAM and language and social communication scores. In the AMR subgroup, some inflammatory parameters showed an association with repetitive behavior (MPO and RANTES), stereotypes (IL8), and social interaction scores (IL6).

## DISCUSSION

The study results show that there are no significant differences between the levels of cytokines, cell adhesion molecules or growth factors in ASD children compared to those in typically-developing children. Nevertheless, in the ANMR subgroup of autistic children, lower plasma levels of the NCAM adhesion molecule were detected compared to the levels in the AMR subgroup and the control group. This ANMR group also exhibited higher NGF levels than the typically-developing children, which could indicate an alteration in neuronal development. These results seem to confirm the great heterogeneity of autism and the need to differentiate the pathophysiological pathways to define the phenotype spectrum and more specific and individualized therapies.

In addition to the established criteria of DMS-5 and the use of ADOS 2 for the diagnostic assessment of patients with ASD, other complementary tests were performed to evaluate the developmental level and the severity of the autistic symptomatology. These included the Battelle Developmental Inventory, PDBBI-Parent Ratings and CARS-2. These tests were instrumental in the identification of clinical characteristics in the ASD neurodevelopmental regression subgroup and ASD-diagnosed children without neurodevelopmental regression.

The immunological role in the etiopathogenesis of ASD is a matter of ongoing debate among researchers. There is evidence of an alteration in the immune system of children with ASD, which includes increased cytokine levels in both the brain and plasma



**FIGURE 1 |** The neuronal cell adhesion molecule (NCAM) and nerve growth factor (NGF) plasma levels in children with autism subdivided as follows: AMR (mental regression group), ANMR (non-mental regression group) and a healthy control group.

**TABLE 3 |** Significant correlations between plasma biomarker levels and behavioral impairments and associated quantitative clinical traits.

Autism Spectrum Disorders		ANMR		AMR	
Tests/Biomarkers		ICAM	MPO	IL8	MCP-1
PDDBI	EXPRESS	$r: -0.406$ $p: 0.023$			
	SOCAPP	$r: -0.359$ $p: 0.048$			
	REPRITC		$r: 0.507$ $p: 0.038$		
ADOS	Stereotypes			$r: 0.84$ $p: 0.01$	
Battelle	Personal				$r: -0.52$ $p: 0.024$
	Expression				$r: -0.75$ $p: 0.001$
	Communication				$r: -0.71$ $p: 0.001$

AMR, mental regression group; ANMR, non-mental regression group; ICAM, intercellular adhesion molecule; MPO, myeloperoxidase; IL8, interleukin 8; MCP-1, monocyte chemoattractant protein. ADOS, Autism Diagnostic Observation Schedule; CARS, Childhood Autism Rating Scale Test; PDDBI, PDD Behavior Inventory; EXPRESS, Expressive language; EXSCA, expressive social communication abilities composite; REPRITC, repetitive, ritualistic and pragmatic problems composite. SOCAPP, Social Approach Behaviors.

(14, 26). This theory of immunological alteration is based on the knowledge that the brain is able to recognize cytokines, such as the proinflammatory cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6, as molecular signals of sickness (27). The immune system and the nervous system are in constant two-way communication, with each exerting a degree of control over the other (28).

Although many studies have reported altered levels of immune-related biomarkers or abnormal immune function in ASD, it has been surprisingly difficult to identify a consistent pattern of immunological alteration across the various studies, or develop a pathophysiological description of this alteration. For example, Onore et al. (29), have reported increased levels of

proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, p40), as well as macrophage migration inhibitory factor and platelet-derived growth factor (PDGF) in patients with autism. El-Ansary et al. (30) reported that Saudi patients with autism have markedly higher plasma HSP70, TGF- $\beta$ 2, Caspase-7, and INF- $\gamma$  levels compared to age and gender-matched controls. Other authors have also reported that children with ASD showed altered levels of immunological parameters, including CCL2, CCL5, and CXCL9 levels, compared to healthy children (31). Recently, findings showing increased levels of S100B and TNF $\alpha$  in patients with ASD have been published (26). Xie et al. (25) have also observed increased blood TNF $\alpha$  concentrations associated with symptom severity. Indeed, the levels of TNF $\alpha$  in the Xie autism group showed a tendency toward significance ( $p: 0.07$ ). It is possible therefore that the statistical significance would tend to increase if the protocol were replicated in a larger sample.

Other authors (32) by contrast, as in the present study, have found no difference between the cytokine levels of children with ASD and those of typically-developing children. For example, Napolini et al. (33) observed no increase in cytokines in a batch of up to 40 inflammatory parameters in the peripheral blood of children with ASD aged 6–8, and evidence that the immune profiles of children with ASD did not differ from those of their typically-developing siblings. Ashwood et al. (14) in an *in vitro* study and Guloksuz et al. (26) in their plasma studies also reported no differences in cytokine levels comparing different subtypes of ASD. These results cannot support a direct relation between an inflammatory status and ASD. However, an etiopathogenic implication of an immunological activation during the prenatal period has been described (34), but peripheral blood cytokine measurements may not directly correlate with changes in the central nervous system.

Cathepsin D, a protease abundantly expressed in the brain, can trigger apoptosis and secretion of cytokines, including IL-4, IL-8, IL-10, and IL-13. Malik et al. (35) have reported an increase in cathepsin D, and the corresponding increase in proinflammatory cytokines (TNF $\alpha$ -and IL-6) and apoptosis in autistic lymphoblasts, suggesting that cathepsin D may play an important role in cytokine-induced apoptosis. However, this



study was conducted using a small sample of six children with ASD and was an *in vitro* study, which may account for the differences with the present findings.

Immune globulin-like cell adhesion molecules (CAMs) constitute a broad family, including NCAM, sICAM-1 and vCAM-1, required for tissue formation, maintenance and function. NCAM is related to a dynamic connection between cells, and decreased plasma levels of children with ASD compared to those in age-matched controls have been reported. This finding emphasizes the difference with other psychiatric pathologies, such as schizophrenia, in which these levels are elevated (36). However, other studies have found that NCAM mRNA levels were not altered in either serum samples or postmortem brain samples (37) taken from children with ASD. Jovanova-Nesic et al. (38) have also observed a decrease in the expression of NCAM-1 in the CA1 and CA3 fields of the hippocampus and, to a lesser extent, in the basal ganglia, limbic structures and cervical spinal cord.

A protective effect of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) on injured DA cells has been shown through its influence on NCAM (39). In the present study, a decrease in NCAM levels was detected in the ANMR subgroup; this may point to an incident having taken place at an earlier time, possibly during the early stages of embryonic development. The first years of development are known to be crucial for the formation of neural circuits, when there is a high predisposition to interruption. CAMs play a crucial role in many aspects of neural circuit formation and an alteration in these molecules can lead to an alteration in neuronal growth and synaptogenesis.

The plasma levels of VCAM and ICAM have been studied in high-functioning adults with ASD, revealing a decrease in the former molecule and normal levels of the latter (40). Similar results have been observed in other patients with ASD (17). However, the present study, focusing on the plasma levels of children with ASD aged 2–6, did not detect any such anomalies.

There are multiple lines of evidence indicating that immune responses and CAM levels correlate to the severity of behavioral impairments and associated symptoms and quantitative clinical traits (13, 14). Thus, dysregulation of IL-1 is implicated in impairments in memory and learning, and increases in MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , and IP-10 are significantly associated with social behavior (16). Furthermore, disrupting NCAM has been shown to lead to several memory and learning deficits. In the present study, the levels of the biological parameters studied differed between the children with ASD who exhibited neurodevelopmental regression and those who did not show regression, suggesting an association between the parameters and behavioral/developmental outcomes. This finding supports the theory of different pathophysiological pathways with an earlier incident in the ANMR subgroup, as opposed to a possible subsequent aggression during the early stages of life in the AMR subgroup, something that requires clarification in future research. However, the significant association of cytokine levels with quantitative traits and the clinical subgroups analyzed suggests that altered immune responses may affect the core ASD characteristics.

An increasing body of evidence indicates that growth factors modulate motor, emotional and cognitive functions, which may explain several clinical manifestations of these disorders (41). The results regarding plasma levels of BDNF in patients with ASD (24, 42, 43) are inconsistent. BDNF, which is the most abundant neurotrophin in the CNS, can cross the blood-brain barrier, and levels in plasma and brain are highly correlated. Other growth factors have not been investigated as widely. NGF is also a member of the neurotrophin family and is involved in the growth, differentiation, survival and regeneration of nerve cells by stimulating Trk A (a transmembrane tyrosine kinase) and p75 receptors. NGF is primarily present in highly functional brain regions (41). In line with the present authors, other researchers have observed increased levels of NGF in children with ASD (44) and hyperactivity (45). In the present study, NGF was detected in fewer than 50% of the children with ASD and typically-developing children, which may be related to the early stage of life, or the sensitivity of the analysis. Second, increased NGF levels were observed in the ANMR subgroup, which also exhibited decreased levels of NCAM. Thus, although we did not observe an inverse association between these two molecules in the ANMR subgroup, the enhancement in NGF levels after brain disruption may be a part of a neuronal recovery process. This mechanism is possibly similar to the one related to NCAM and GDNF (39). HGF seems to be particularly active in the nervous system, and it plays a significant role in the neurodevelopmental process, including synapse formation (46). Significantly low levels of HGF have been described in high-functioning children with ASD (47). An association has been described between HGF serum levels and the presence of gastrointestinal disease, which is sometimes linked to ASD in subgroups of children (48). In our study, no differences were identified in the group of children with ASD.

The present observational case-control study has certain limitations. Given that the prevalence of ASD is 1%, 50 patients with ASD needed to be recruited to the study; an advantage is that clinical variability is avoided when the study is performed in a single hospital with a strict protocol and very restrictive inclusion and exclusion criteria. It is impossible to know whether the variations detected in the ASD group are a cause or a consequence of the disorder. Such highly varying results may be accounted for not only by the differences in the way this study was approached but also by the natural heterogeneity of ASD, which is still not well understood. However, this study benefits from a careful selection of children of similar ages, as well as the complete diagnosis of ASD with multiple tests, clinical follow-up and associated complementary tests. In addition, none of the ASD children were undergoing any concomitant treatment shown to modify the plasma levels of the molecules being measured. Discrepancies within the authors' results may be partly explained by the different techniques used for analysis, as the ELISA and RIAC assays are more sensitive than the Luminex assay; however, the latter allows the measurement of more analytes with a minimal volume.

In conclusion, the results of this study show that there is not a typical profile for the expression of relevant plasma cytokines,

adhesion molecules or growth factors in children with ASD compared with that in typically-developing children. However, in the ANMR and AMR subgroups, some of the adhesion molecules and neuronal growth factors that could be involved in an early alteration in neurodevelopment exhibited differences. ASD is a heterogeneous pathology that converges in different ASD phenotypes; the key biomarkers in the etiology of ASD, which remains unknown, must therefore be subjected to further investigation.

## ETHICS STATEMENT

This protocol was approved by the Clinical Research and Bioethics Committee at the Hospital Reina Sofia of Córdoba, respecting the fundamental principles established in the Declaration of Helsinki and informed consent was obtained from the parent or guardian of each participant before testing.

## REFERENCES

1. APA. *DSM-V* (2013). Available online at: [www.dsm5.org/Pages/Default.aspx](http://www.dsm5.org/Pages/Default.aspx).
2. Menezo YJR, Elder K, Dale B. Link between increased prevalence of autism spectrum disorder syndromes and oxidative stress, DNA Methylation, and Imprinting. *JAMA Pediatr.* (2015) 169:1066–7. doi: 10.1001/jamapediatrics.2015.2125
3. Kern JK, Geier DA, Geier MR. Evaluation of regression 413 in autism spectrum disorder based on parental reports. *N Am J Med Sci.* (2014) 6:41–7. doi: 10.4103/1947-2714.125867
4. Hansen RL, Ozonoff S, Krakowiak P, Angkustsiri K, Jones C, Deprey LJ, et al. Regression in autism: prevalence and associated factors in the CHARGE study. *Ambul Pediatr.* (2008) 8:25–31. doi: 10.1016/j.ambp.2007.08.006
5. Morales-Hidalgo P, Roigé-Castellví J, Hernández-Martínez C, Voltas N, Canals J. Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among spanish school-age children. *J Autism Dev Disord.* (2018) 48:3176–90. doi: 10.1007/s10803-018-3581-2
6. Baxter AJ, Brugha TS, Erskine HE, Scheurer RW, Vos T, Scott JG. The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. *Psychol Med.* (2015) 45:601–13. doi: 10.1017/S003329171400172X
7. Baio J, Wiggins L, Christensen DL, Maenner MJ, Daniels J, Warren Z, et al. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years – autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ.* (2018) 67:1–23. doi: 10.15585/mmwr.ss6706a1
8. Kern JK, Geier DA, Sykes LK, Geier MR. Relevance of neuroinflammation and encephalitis in Autism. *Front Cell Neurosci.* (2016) 9:519. doi: 10.3389/fncel.2015.00519
9. Molloy CA, Morrow AL, Meinzen-Derr J, Schleifer K, Dienger K, Manning-Courtney P, et al. Elevated cytokine levels in children with autism spectrum disorder. *J Neuroimmunol.* (2006) 424:198–205. doi: 10.1016/j.jneuroim.2005.11.007
10. Enstrom AM, Onore CE, Van de Water JA, Ashwood P. Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun.* (2010) 24:64–71. doi: 10.1016/j.bbi.2009.08.001
11. Theoharides TC, Tsilioni I, Patel AB, Doyle R. Atopic diseases and inflammation of the brain in the pathogenesis of autism spectrum disorders. *Transl Psychiatry* (2016) 6:e844. doi: 10.1038/tp.2016.77
12. Angelidou A, Asadi S, Alysandratos KD, Karagkouni A, Kourembanas S, Theoharides TC. Perinatal stress, brain inflammation and risk of autism-review and proposal. *BMC Pediatrics* (2012) 12:89. doi: 10.1186/1471-2431-12-89
13. Onore C, Enstrom A, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Van de Water J, Ashwood P. Decreased cellular IL-23 but not IL-17 production in children with autism spectrum disorders. *J Neuroimmunol.* (2009) 216:126–9. doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.09.005
14. Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah IN, Van de Water J. Associations of impaired behaviors with elevated plasma chemokines in autism spectrum disorders. *J Neuroimmunol.* (2011) 232:196–9. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.10.025
15. Suzuki K, Sugihara G, Ouchi Y, Nakamura K, Futatsubashi M, Takebayashi K, et al. Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. *JAMA Psychiatry.* (2013) 70:49–58. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2013.272
16. Shen Y, Ou J, Liu M, Shi L, Li Y, Xiao L, et al. Altered plasma levels of chemokines in autism and their association with social behaviors. *Psychiatry Res.* (2016) 224:300–5. doi: 10.1016/j.psychres.2016.07.057
17. Kamenoy Y, Iwata K, Matsuzaki H, Miyachi T, Tsuchiya KJ, Matsumoto K, et al. Serum levels of soluble platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 are decreased in subjects with autism spectrum disorder. *Mol Autism* (2013) 4:19. doi: 10.1186/2040-2392-4-19
18. Kim SH, Lord C. New autism diagnostic interview-revised algorithms for toddlers and young preschoolers from 12 to 47 months of age. *J Autism Dev Disord.* (2012) 42:82–93. doi: 10.1007/s10803-011-1213-1
19. Lord C, Rutter M, DiLavore PC, Risi S, Gotham K, Bishop SL. *Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS): Manual.* Los Angeles, CA: WPS (2001)
20. Cohen IL, Sudhalter V. *PDD Behavior Inventory (PDDBI).* Lutz, FL: Psychological Assessment Resources (2005).
21. Scholper E, Van Bourgondien ME, Wellman GJ, Love SR. *Childhood Autism Rating Scale-454 (CARS-2).* Los Angeles, CA: Western Psychological Services. (2010).
22. Newborg S, Wnek G, Svinicki. *Battelle Developmental Inventory Screening Test.* Chicago, IL: Riverside Publishing Company (2016).
23. Goodman A, Goodman R. Strengths and difficulties questionnaire scores and mental health in looked after children. *Br J Psychiatry* (2012) 200:426–7. doi: 10.1192/bjp.bp.111.104380
24. Zheng Z, Zhang L, Zhu T, Huang J, Qu Y, Mu D. Peripheral brain-derived neurotrophic factor in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* (2016) 6:31241. doi: 10.1038/srep31241
25. Xie J, Huang L, Li X, Li H, Zhou Y, Zhu H, et al. Immunological cytokine profiling identifies TNF- $\alpha$  as a key molecule dysregulated in autistic children. *Oncotarget* (2017) 8:82390–8. doi: 10.18632/oncotarget.19326
26. Guloksuz SA, Abali O, Aktas Cetin E, Bilgic Gazioglu S, Deniz G, Yildirim A, Leckman, J.F. Elevated plasma concentrations of S100 calcium-binding protein B and tumor necrosis factor alpha in children with autism spectrum disorders. *Rev Bras Psiquiatr.* (2017) 39:195–200. doi: 10.1590/1516-4446-2015-1843

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AG-F, MG-C, and JP-N contributed to the study conception and study design. AG-F, KF-R, and PM-B collected all the data, acquired the behavioral data, and assisted with regulatory responsibilities. MC-R carried out the analysis. MJT-A and MG-C were responsible for the interpretation of the data, as well as drafting the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## FUNDING

This study was supported by the FUNDACIÓ AGRUPACIÓ Àmbit de la Infància, 404 Research Grant INVEST from the Spanish Society of Pediatrics and Red de Salud Materno Infantil (RED SAMID). The funding bodies did not have any role in the design, collection, analyses, or interpretation of data or in writing the manuscript.

27. Masi A, Glozier N, Dale R, Guastella AJ. The immune system, cytokines, and biomarkers in autism spectrum disorder. *Neurosci Bull.* (2017) 33:194–204. doi: 10.1007/s12264-017-0103-8
28. Mead J, Ashwood P. Evidence supporting an altered immune response in ASD. *Immunol Lett.* (2015) 163:49–55. doi: 10.1016/j.imlet.2014.11.006
29. Onore C, Careaga M, Ashwood P. The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain Behav Immun.* (2012) 26:383–92. doi: 10.1016/j.bbi.2011.08.007
30. El-Ansary A, Al-Ayadhi L. Neuroinflammation in autism spectrum disorders. *J Neuroinflamm.* (2012) 9:265. doi: 10.1186/1742-2094-9-265
31. Han YM, Cheung WK, Wong CK, Sze SL, Cheng TW, Yeung MK, et al. Distinct cytokine and chemokine Profiles in autism spectrum Disorders. *Front Immunol.* (2017) 8:11. doi: 10.3389/fimmu.2017.00011
32. Bryn V, Aass HC, Skjeldal OH, Isaksen J, Saugstad OD, Ormstad H. Cytokine profile in autism spectrum disorders in children. *J Mol Neurosci.* (2017) 61:1–7. doi: 10.1007/s12031-016-0847-z
33. Napolioni V, Ober-Reynolds B, Szelinger S, Corneveaux JJ, Pawlowski T, Ober-Reynolds S, et al. Plasma cytokine profiling in sibling pairs discordant for autism spectrum Disorder. *J Neuroinflamm.* (2013) 10:38. doi: 10.1186/1742-2094-10-38
34. Abdallah MW, Larsen N, Mortensen EL, Atladóttir HÓ, Nørgaard-Pedersen B, Bonefeld-Jørgensen EC, et al. Neonatal levels of cytokines and risk of autism spectrum disorders: an exploratory register-based historical birth cohort study utilizing the Danish Newborn Screening Biobank. *J Neuroimmunol.* (2012) 252:75–82. doi: 10.1016/j.jneuroim.2012.07.013
35. Malik M, Sheikh A M, Wen G, Spivack W, Brown WT, Li X. Expression of inflammatory cytokines, Bcl2 and cathepsin D are altered in lymphoblasts of autistic subjects. *Immunobiology* (2011) 216:80–5. doi: 10.1016/j.imbio.2010.03.001
36. Plioplys AV, Hemmens SE, Regan CM. Expression of a neural cell adhesion molecule serum fragment is depressed in autism. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* (1990) 2:413–7. doi: 10.1176/jnp.2.4.413
37. Purcell AE, Rocco M, Lenhart JA, Hyder K, Zimmerman AW, Pevsner J. Assessment of neural cell adhesion molecule (NCAM) in autistic serum and postmortem brain. *J Autism Devdisord.* (2001) 31:183–94.
38. Jovanova-Nesic K, Shoenfeld Y. MMP-2, VCAM-1 and NCAM-1 expression in the brain of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis as a trigger mechanism for synaptic plasticity and pathology. *J Neuroimmunol.* (2006) 181:112–21. doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.08.013
39. Li L, Chen H, Wang M, Chen F, Gao J, Sun S, et al. NCAM-140 Translocation into Lipid Rafts Mediates the Neuroprotective Effects of GDNF. *Mol Neurobiol.* (2017) 54:2739–51. doi: 10.1007/s12035-016-9749-x
40. Tsuchiya KJ, Hashimoto K, Iwata Y, Tsujii M, Sekine Y, Sugihara G, et al. Decreased serum levels of platelet-endothelial adhesion molecule (PECAM-1) in subjects with high-functioning autism: a negative correlation with head circumference at birth. *Biol Psychiatry* (2007) 62:1056–8. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.12.018
41. Galvez-Contreras AY, Campos-Ordóñez T, Gonzalez-Castaneda RE, Gonzalez-Perez O. Alterations of growth factors in autism and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Front Psychiatry.* (2017) 8:126. doi: 10.3389/fpsyt.2017.00126
42. Qin X-Y, Feng J-C, Cao C, Wu H-T, Loh YP, Cheng Y. Association of peripheral blood levels of brain-derived neurotrophic factor with autism spectrum disorder in children: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Pediatr.* (2016) 170:1079–86. doi: 10.1001/jamapediatrics.2016.1626
43. Rodrigues DH, Rocha NP, Sousa LF da C, Barbosa IG, Kummer A, Teixeira AL. Circulating levels of neurotrophic factors in autism spectrum disorders. *Neuro Endocrinol Lett.* (2014) 35:380–4.
44. Chaldarov GN, Tonchev AB, Aloe L. NGF and BDNF: from nerves to adipose tissue, from neurokines to metabokines. *Rivista di psichiatria.* (2009) 44:79–87.
45. Guney E, Ceylan ME, Kara M, Tekin N, Goker Z, Senses Dinc G, et al. Serum nerve growth factor (NGF) levels in children with attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Neurosci Lett.* (2014) 560:107–11. doi: 10.1016/j.neulet.2013.12.026
46. Xie Z, Eagleson KL, Wu HH, Levitt P. Hepatocyte Growth Factor Modulates MET receptor tyrosine kinase and  $\beta$ -Catenin functional interactions to enhance synapse formation. *eNeuro* (2016) 29:3. doi: 10.1523/ENEURO.0074-16.2016
47. Sugihara G, Hashimoto K, Iwata Y, Nakamura K, Tsujii M, Tsuchiya KJ, et al. Decreased serum levels of hepatocyte growth factor in male adults with high-functioning autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* (2007) 31:412–15. doi: 10.1016/j.pnpbp.2006.10.010
48. Russo AJ, Krigsman A, Jepson B, Wakefield A. Decreased serum hepatocyte growth factor (HGF) in autistic children with severe gastrointestinal disease. *Biomark Insights* (2009) 27:181–90.

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Gomez-Fernandez, de la Torre-Aguilar, Gil-Campos, Flores-Rojas, Cruz-Rico, Martin-Borreguero and Perez-Navero. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Article

# Autism Spectrum Disorder (ASD) with and without Mental Regression is Associated with Changes in the Fecal Microbiota

Julio Plaza-Díaz <sup>1,2,3,†</sup>, Antonio Gómez-Fernández <sup>4,†</sup>, Natalia Chueca <sup>3</sup>,  
María José de la Torre-Aguilar <sup>4</sup>, Ángel Gil <sup>1,2,3,5</sup>, Juan Luis Perez-Navero <sup>4,\*</sup>,  
Katherine Flores-Rojas <sup>4,5</sup>, Pilar Martín-Borreguero <sup>6</sup>, Patricio Solis-Urra <sup>7,8</sup>,  
Francisco Javier Ruiz-Ojeda <sup>9</sup>, Federico Garcia <sup>3</sup> and Mercedes Gil-Campos <sup>4,5</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology II, School of Pharmacy, University of Granada, 18071 Granada, Spain; jrplaza@ugr.es (J.P.-D.); agil@ugr.es (Á.G.)

<sup>2</sup> Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix”, Center of Biomedical Research, University of Granada, 18016 Armilla, Granada, Spain

<sup>3</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria IBS.GRANADA, Complejo Hospitalario Universitario de Granada, 18014 Granada, Spain; naisses@yahoo.es (N.C.); fegarcia@ugr.es (F.G.)

<sup>4</sup> Pediatric Research and Metabolism Unit, Reina Sofia University Hospital, Maimónides Institute for Biomedical Research of Córdoba (IMIBIC), University of Córdoba, 14010 Córdoba, Spain; antoniogofede@hotmial.com (A.G.-F.); delatorremj4@gmail.com (M.J.d.l.T.-A.); katherine1.flores@gmail.com (K.F.-R.); mercedes\_gil\_campos@yahoo.es (M.G.-C.)

<sup>5</sup> CIBEROBN (CIBER Physiopathology of Obesity and Nutrition), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain

<sup>6</sup> Department of Child and Adolescent Clinical Psychiatry and Psychology, Reina Sofia University Hospital, Maimónides Institute for Biomedical Research of Córdoba (IMIBIC), 14010 Cordoba, Spain; pmartin.psicologa@gmail.com

<sup>7</sup> PROFITH “PROmoting FITness and Health through physical activity” research group, Department of Physical Education and Sport, Faculty of Sport Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain; patricio.solis.u@gmail.com

<sup>8</sup> IRyS Research Group, School of Physical Education, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso 2374631, Chile

<sup>9</sup> RG Adipocytes and metabolism, Institute for Diabetes and Obesity, Helmholtz Diabetes Center at Helmholtz Center Munich, 85748 Garching, Munich, Germany; francisco.ruiz@helmholtz-muenchen.de

<sup>†</sup> Both authors contributed equally.

\* Correspondence: jrplaza@correo.ugr.es; Tel.: +34-957-736-467; Fax: 003-495-701-0019

Received: 31 December 2018; Accepted: 1 February 2019; Published: 5 February 2019

**Abstract:** New microbiome sequencing technologies provide novel information about the potential interactions among intestinal microorganisms and the host in some neuropathologies as autism spectrum disorders (ASD). The microbiota–gut–brain axis is an emerging aspect in the generation of autistic behaviors; evidence from animal models suggests that intestinal microbial shifts may produce changes fitting the clinical picture of autism. The aim of the present study was to evaluate the fecal metagenomic profiles in children with ASD and compare them with healthy participants. This comparison allows us to ascertain how mental regression (an important variable in ASD) could influence the intestinal microbiota profile. For this reason, a subclassification in children with ASD by mental regression (AMR) and no mental regression (ANMR) phenotype was performed. The present report was a descriptive observational study. Forty-eight children aged 2–6 years with ASD were included: 30 with ANMR and 18 with AMR. In addition, a control group of 57 normally developing children was selected and matched to the ASD group by sex and age. Fecal samples were analyzed with a metagenomic approach using a next-generation sequencing platform. Several



differences between children with ASD, compared with the healthy group, were detected. Namely, *Actinobacteria* and *Proteobacteria* at phylum level, as well as, *Actinobacteria*, *Bacilli*, *Erysipelotrichi*, and *Gammaproteobacteria* at class level were found at higher proportions in children with ASD. Additionally, *Proteobacteria* levels showed to be augmented exclusively in AMR children. Preliminary results, using a principal component analysis, showed differential patterns in children with ASD, ANMR and AMR, compared to healthy group, both for intestinal microbiota and food patterns. In this study, we report, higher levels of *Actinobacteria*, *Proteobacteria* and *Bacilli*, aside from *Erysipelotrichi*, and *Gammaproteobacteria* in children with ASD compared to healthy group. Furthermore, AMR children exhibited higher levels of *Proteobacteria*. Further analysis using these preliminary results and mixing metagenomic and other “omic” technologies are needed in larger cohorts of children with ASD to confirm these intestinal microbiota changes.

**Keywords:** autism spectrum disorder; children; intestinal microbiota; nutrients

---

## 1. Introduction

The advent of new sequencing technologies has stimulated the beginning of new research to ascertain the connections between the microbial communities that reside in our gut and some physiological and pathological conditions. The microbiota, defined as the full collection of microbes (bacteria, fungi, viruses, among others) that naturally exist within a particular biological niche, is estimated to contain 500–1,000 species [1–3], and has an important impact on human health. In particular, the gut microbiota may play a key role in many essential processes in health and disease via the activity of the gut-brain axis, possibly contributing to autism spectrum disorders (ASD), Alzheimer’s disease, Parkinson’s disease, depression, and anxiety disorders, among others [4].

ASD is a severe neurodevelopmental disorder that impairs child’s ability to communicate and interact with others. Children with neurodevelopmental disorders, including ASD, are regularly affected by gastrointestinal problems and dysbiosis of the gut microbiota [5]. Autism diagnoses have increased rapidly over the last decade (currently 1 in 59 births, versus 1 in 150 reported in 2000 in the United States [6]). In the case of Spain, the estimated prevalence is 1.55% in preschoolers and 1.00% in school-age children, and male-to-female ratio was around 4:1 [7].

The pathophysiology of ASD still remains largely unknown. However, a disorder of the microbiota–gut–brain axis is emerging as a prominent factor in the generation of autistic behaviors [8]. Evidence so far suggests prognosis is not pre-determined and there is a dynamic component of disease. Many studies highlight the possibility for environmental risk factors and associated medical co-morbidities to contribute to core neurobehavioral symptoms of the disorder [9–11]. Co-morbid gastrointestinal symptoms in some subsets of ASD individuals include diarrhea/constipation, abdominal pain and gastric reflux. In relation with this phenotype, deficient integrity of the gut epithelium and increased intestinal permeability have been reported [12]. In addition, evidence from animal models suggests that certain microbial shifts in the gut may produce changes consistent with the clinical picture of autism, with proposed mechanisms including toxin production, aberrations in fermentation processes/products, and immunological and metabolic abnormalities [13].

Currently, animal model evidence [14,15], as well as more limited human studies have demonstrated that signaling along the gut-microbiome-brain axis is a critical regulator of both central nervous system and immune function [16,17]. Previous studies have shown microbial changes in the intestinal microbiota of children with ASD compared with healthy subjects in certain bacteria genera belonging to the phyla *Bacteroidetes*, such as *Bacteroides*, *Barnesiella*, *Odoribacter*, *Parabacteroides*, *Prevotella* and *Alistipes*, and belonging to *Proteobacteria* (e.g., *Proteus*, *Parasutterella*). In contrast, *Bifidobacterium* species, belonging to the phylum *Actinobacteria*, were decreased [18,19]. *Akkermansia muciniphila* (phylum *Verrucomicrobia*), was found in high levels in children suffering ASD [20,21]. However, these studies have reported a low number of evaluated samples (from 11 to 33 children), and none of the aforementioned defined appropriately the diversity of phenotypes

within the ASD children population. It is well established that children with ASD do not constitute a homogeneous clinical group, and many different pathologies show a similar constellation of behavioral symptoms that converge within ASD [22] for example, the existence of developmental regression in some children with ASD has been corroborated by multiple studies [23]. Many studies report dysbiosis of the gut microbiota in ASD individuals [24,25]. Alterations in the gut microbiota are observed in ASD individuals compared to neurotypical controls. Increased clostridia species in autism have been reported in several studies and microbiome alterations that might contribute to the development of autism include altered immune function and bacterial metabolites [26]. Other authors have hypothesized that an increase in *Candida* spp. could be looked at as precocious index of intestinal dysbiosis. However, none correlation was observed between detected counts of *Candida* spp. and gastrointestinal symptoms in ASD children [24]. ASD severity was also linked to a reduction in short-chain fatty acids (SCFAs), including acetate, propionate and butyrate [27], which are modulated by gut microbes. In the case of mental regression, the information is scarce.

The gastrointestinal tract is an organ that is co-dominated by the central nervous system (CNS), the autonomic nervous system, and the enteric nervous system (ENS). Regulation of enteric nerves consists of different levels of nervous regulation [28]. This type of neuroendocrine network, which connects the gastrointestinal tract with the CNS at different levels, is the structural basis for the function of the microbiota gut-brain axis. Disorders of neurological control, such as ASD, at any level will affect the function of the gut and brain. The gut has a direct neural connection with the brain through the vagus nerve, and bacteria can stimulate the afferent neurons of the ENS [29]. The vagus signal from the gut can trigger an anti-inflammatory response against the sepsis induced by microorganisms. Gut microorganisms can affect brain functions through the vagus nerve; after a vagotomy, the microorganisms will not be able to regulate behaviors [30,31].

Glial cells (in particular microglia and astrocytes) influence synapse formation and function [32,33]. Microglia are immune cells in the CNS, and studies have found that the metabolism of gut microorganisms can regulate the maturation and function of microglia, thereby affecting CNS function [34]. Both elevated microglial activation and altered microglia to neuron spatial distribution patterns have been observed in the cerebral cortex and cerebellum of postmortem ASD brains [35,36] and surrogate markers of increased microglial activation have shown by positron-emission tomography imaging of living ASD individuals [37].

Interestingly, Erny and colleagues have demonstrated that the microbiome is required for proper development and function of adult brain microglia [34]. Microglia from germ-free mice exhibit altered morphology, with longer processes and increased branching, and altered transcriptomes including down-regulation of cell activation genes, reduction of genes for type 1 IFN receptor signaling, and up-regulation of microglia transcription and survival factors compared to those isolated from conventionally-colonized controls. Re-colonization of adult gnotobiotic mice with a conventional gut microbiota or supplementation with SCFAs corrects these deficiencies in microglial activation [34,38]. Recently, Lu et al. have reported that growth-associated microbiota can influence early neuron and oligodendrocyte development and this effect may be mediated by effects on neuroinflammation and circulating IGF-1 [39].

In addition, diet might contribute to the development of phenotypic diversity in ASD children influencing their behavior [40]. Recently, changes in brain structure were found to be associated with diet-dependent changes in gut microbiome populations using a machine learning classifier for quantitative assessment of the strength of microbiome-brain region associations [41].

Scarce information about children with ASD intestinal microbiota changes is available. Furthermore, there is a lack of knowledge about how mental regression would affect eating behavior and intestinal microbiota in ASD children. Thus, the aim of the present study was to evaluate the fecal metagenomic profiles in children with ASD and compare them with healthy participants, in order to ascertain how other important variable in ASD as mental regression could influence the intestinal microbiota profile. For this reason, a sub-classification in children with ASD by mental regression (AMR) and no regression (ANMR) phenotype was performed to augment the knowledge

of gut-brain-microbiota axis, highlighting the potential impact of diet and metagenomic effects in neuropathologies.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Ethical Statement

The present study was a cross-sectional case-control study and was approved by the Clinical Research and Bioethics Committee at Reina Sofia University Hospital respecting the fundamental principles established in the Declaration of Helsinki. The selected subjects were incorporated into the study after all inclusion criteria were fulfilled and informed written consents from the children's legal guardians were obtained.

### 2.2. Participants

Fifty-seven children with ASD were initially selected for this descriptive observational study (the recruitment started during 2015 in the Department of Psychology of the Pediatric Service). Of those, three children were excluded for not meeting the diagnostic criteria for ASD during the subsequent follow-up interviews at 18 months [22]. Such interviews (Autism Diagnostic Interview—Revised ADI-R) were a follow-up to verify if the individuals continued meeting the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5) criteria.

All selected children with ASD were between 2–6 years old with an agreed clinical diagnosis using the criteria of the International Classification Disease 10th Edition for ASD [42] and DSM-5 [43]. The diagnosis was confirmed by scores above the cut-off points of two tests, the Autism Diagnostic Observation Schedule test, with revised algorithms, and the Pervasive Developmental Disorders (Behavior Inventory [PDDBI]), the latter as a means of obtaining a measure of the severity of ASD. The ASD group was also classified according to whether the children presented developmental delay (a score lower than 70 in the cognitive quotient of the Battelle developmental test) or not. Within the ASD group, 20 children were classified as AMR and 32 as ANMR: two children could not be clearly classified into either subgroup. The subdivision (ANMR and AMR) was based on the presence or absence of developmental regression during the first two years of life, which was assessed by a five-item questionnaire following the guide used by the ADI-R clinical interview for the evaluation of this process [44]. Children with ASD who obtained a score equal to three or greater, were included in the mental regression group, whereas those with a score of less than this value were included in the non-mental regression group [22].

Children with ASD presenting other known neurological, metabolic or genetic diagnoses were excluded, as were children with medical treatment for autism-related behavioral comorbidities that may interfere with the results, such as sedatives, muscle relaxants or similar.

Additionally, a control group of 57 normally developing children was selected and matched to the ASD group by sex and age. Children in the control group were chosen from those who came to the hospital for pre-anesthesia for minor surgery (mainly hernias). The clinical and analytical absence of illness in this group of healthy children was confirmed.

Finally, the metagenomic fecal analysis included 18 children classified as AMR, 30 classified as ANMR and 57 as control group.

### 2.3. Assessment of Diet

Guardians completed a 24-h dietary record during the intervention period. In addition, one of the authors (KF) applied a validated semiquantitative food frequency questionnaire. Energy consumption and dietary intakes of macro- and micronutrients data were estimated using the Odimet software (University of Santiago de Compostela, Spain; <http://www.odimet.es/>). The Spanish Community Nutrition Society (SENC) Guidelines for scholar age were used to compare the actual food intake of ASD and healthy children with the standard recommendations [45].

## 2.4. Metagenomic Analysis

### 2.4.1. DNA Extraction

Fecal samples were collected in plastic sterile containers from each volunteer and then transferred to -80 °C until analysis. Fecal samples were homogenized in a Stomacher-400 blender. DNA was extracted using a QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Barcelona, Spain) as directed by the manufacturer, with the exception that samples were mixed with the lysis buffer and incubated at a temperature of 95 °C instead of 70 °C to ensure lysis of both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Quantification was conducted with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, DE, USA). The DNA yield was determined by measuring absorbance ratios spectrophotometrically, and the measurement includes A260/280 nm for protein contamination and A260/230 nm for salt and phenol contamination.

### 2.4.2. Sequencing Analysis

The extracted DNA was PCR amplified using the primer pairs, 16S Amplicon PCR Forward Primer: 5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG, and 16S Amplicon PCR Reverse Primer: 5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC targeting the V3 and V4 hypervariable regions of the bacterial 16S rRNA gene [46]. All PCRs were performed in 25 µL reaction volumes containing 12.5 µL 2X KAPA HiFi Hotstart ready mix (KAPA Biosystems, Woburn, MA, USA), 5 µL of each forward and reverse primers (1 µM) and 2.5 µL of extracted DNA (10 ng) under the following cycling conditions: initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, and elongation at 72 °C for 30 s, with a final extension at 72 °C for 5 min. PCR clean-up was performed using AMPure XP beads (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) to purify the 16S V3 and V4 amplicon away from free primers and primer dimer species. Then, the next step was the index PCR, in this step attaches dual indices and Illumina sequencing adapters using the Nextera XT Index Kit (Illumina, San Diego, CA, USA), PCR conditions were: 95 °C for 3 min; 8 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 30 s; 72 °C for 5 min, and hold at 4 °C. The pooled PCR products were purified using AMPure XP beads (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) before quantification. The resultant amplicons were sequenced at MiSeq (Illumina, USA), using paired-end (2x300nt) Illumina MiSeq sequencing system (Illumina, San Diego, CA, USA).

### 2.4.3. Taxonomic Analysis

Galaxy [47] with the Mothur tool was used for quality assessment of raw reads, which were assembled and screened based on the minimum length of 250 bp and a maximum length of 550 bp. MG-RAST (metagenomics analysis server) [48] using the Ribosomal Database Project (RDP) for analyses of all sequences. The input processing steps in MG-RAST included demultiplexing, quality filtering, length filtering, dereplication, and removal of model organism sequences. The preprocessing options and details of data provided were: FASTQ sequences were filtered using a dynamic trimming. Fifteen was the specific lowest Phred quality score that was counted as a high-quality base and the sequences containing five bases below the value score 15 were trimmed. The raw microbiologic data were reported as relative abundances at the taxonomic levels of phylum, family, and genus. Microbial community diversity, including alpha diversity was analyzed. The observed relative abundance of each taxon was estimated by counting the number of reads for each taxon and then normalizing by the total number of reads per sample.

## 2.5. Statistical Analysis

Data are given as the mean  $\pm$  standard mean error or median and range. *P*-values were obtained from the Mann–Whitney U-test or ANOVA test, as appropriate. *P* value  $< 0.05$  value was considered to be statistically significant. Labeled means or medians without a common letter differ,  $P < 0.05$ . *P*-values were obtained from H Kruskal–Wallis tests corrected by Bonferroni post-hoc test when AMR and ANMR groups were compared with the control group. Principal component analysis (PCA) was used to maximize the information gained for the predominant variables from diet. This mathematical model calculates new variables (principal components) that account for the variability in the metagenomic data and enables the study of covariances or correlations between variables (e.g., total carbohydrates, total fat, among others). The combination of diet variables with the greatest amount of variability is the first principal component. The subsequent components (second and third principal components) describe the maximum amount of remaining variability [49,50]. All of the analyses were performed using the statistical package SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Boxplots were generated using the R software utilizing the ggplot2 package.

### 3. Results

Table 1 shows the general characteristics of ASD and healthy children participants.

**Table 1.** Descriptive characteristic of autism spectrum disorder and healthy children participants.

Variables	ASD			Control ( <i>n</i> = 57)	<i>P</i> value
	ANMR ( <i>n</i> = 30)	AMR ( <i>n</i> = 18)	Total ( <i>n</i> = 48)		
Age (months)	44.51 $\pm$ 2.06	43.69 $\pm$ 2.7	44.19 $\pm$ 1.6	51.00 $\pm$ 2.59	n.s.
Weight (kg)	16.57 $\pm$ 0.56	17.10 $\pm$ 0.95	16.77 $\pm$ 0.50	17.1 $\pm$ 0.6	n.s.
Height (cm)	103.3 $\pm$ 1.55	101.50 $\pm$ 1.92	102.5 $\pm$ 1.20	102.0 $\pm$ 1.5	n.s.
BMI (kg/cm <sup>2</sup> )	15.52 $\pm$ 0.33	16.37 $\pm$ 0.39	15.86 $\pm$ 0.26	16.2 $\pm$ 0.2	n.s.
Battelle test	59.6 $\pm$ 2.6	47.5 $\pm$ 2.6	54.98 $\pm$ 2.0	-	0.003
CARS test	30.6 $\pm$ 1.1	35.9 $\pm$ 1.9	32.7 $\pm$ 1.1	-	0.021
PDDBI test	46.8 $\pm$ 2.3	53.6 $\pm$ 1.6	50.9 $\pm$ 1.6	-	0.026

Data are given as the mean  $\pm$  standard error of the mean. *P*-values were obtained from the Mann-Whitney U-test, or ANOVA test, as appropriate.  $P < 0.05$  value was considered to be statistically significant. Abbreviations: ASD, children with autism spectrum disorders; AMR, children with autism mental regression; ANMR, children with autism non-mental regression; BMI, body mass index; CARS, Childhood Autism Rating Scale test; n.s., non-significant; PDDBI, Pervasive Developmental Disorder Behavior Inventory.

Table 1 also shows the results of the Battelle, Childhood Autism Rating Scale (CARS) and Pervasive Developmental Disorder Behavior Inventory (PDDBI) psychological tests for both, children with AMR and ANMR, which were significantly different between each of them. Regardless of that, only two ASD children out of 48, reported frequent abdominal pain but no other gastrointestinal symptoms.

#### *ASD Children Show Fecal Metagenomic Differences Compared to Healthy Children*

Table 2 shows the relative abundances of predominant phyla and classes between healthy children and children with ASD. All data are classified according to mental regression.

**Table 2.** Relative abundances of bacteria in fecal microbiota of children with ASD and healthy children.

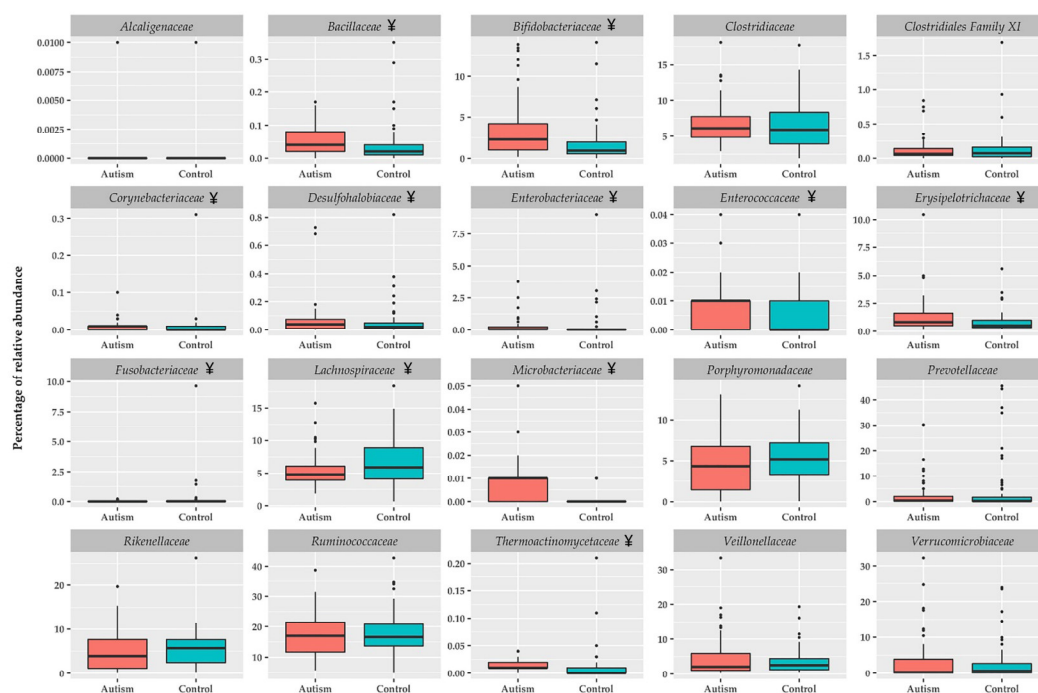
Variables	ASD			Healthy Control Group ( <i>n</i> = 57)
	ANMR Group ( <i>n</i> = 30)	AMR Group ( <i>n</i> = 18)	Total ASD ( <i>n</i> = 48)	
<i>Actinobacteria</i> (phylum)	2.6 (0.6–14.9) <sup>a</sup>	3.2 (0.3–16.8) <sup>ab</sup>	2.9 (0.3–16.8) <sup>*</sup>	1.8 (0.1–18.3) <sup>b</sup>
<i>Bacteroidetes</i> (phylum)	43.4 (2.0–58.1)	39.5 (11.0–51.7)	43.0 (2.0–58.1)	42.9 (8.5–67.9)

<i>Firmicutes</i> (phylum)	45.4 (31.0–82.9)	44.0 (19.6–61.6)	44.7 (19.6–82.9)	42.2 (19.2–81.1)
<i>Proteobacteria</i> (phylum)	0.2 (0.0–4.1) <sup>a</sup>	0.4 (0.1–2.8) <sup>b</sup>	0.4 (0.0–4.1) *	0.2 (0.0–8.9) <sup>a</sup>
<i>Verrucomicrobia</i> (phylum)	0.1 (0.0–24.5)	1.1 (0.0–30.9)	0.3 (0.0–30.9)	0.7 (0.0–23.2)
<i>Actinobacteria</i> (class)	2.6 (0.6–14.9) <sup>a</sup>	3.2 (0.3–16.8) <sup>ab</sup>	2.9 (0.3–16.8) *	1.8 (0.0–18.3) <sup>b</sup>
<i>Bacilli</i> (class)	0.4 (0.1–6.4)	0.4 (0.0–1.9)	0.4 (0.0–6.4) *	0.3 (0.0–2.4)
<i>Bacteroidia</i> (class)	43.3 (1.9–58.1)	39.5 (7.7–51.7)	42.9 (1.9–58.1)	42.9 (8.5–67.9)
<i>Clostridia</i> (class)	36.0 (22.9–51.3)	35.6 (17.2–57.1)	35.6 (17.2–57.1)	37.5 (12.5–65.8)
<i>Deltaproteobacteria</i> (class)	0.1 (0.0–0.8)	0.1 (0.0–1.4)	0.1 (0.0–1.4)	0.07 (0.0–0.9)
<i>Erysipelotrichi</i> (class)	0.6 (0.2–10.1)	0.9 (0.1–4.8)	0.8 (0.1–10.1) *	0.5 (0.2–5.5)
<i>Gammaproteobacteria</i> (class)	0.1 (0.0–3.7)	0.2 (0.0–2.7)	0.1 (0.0–3.7) *	0.04 (0.0–8.8)
<i>Negativicutes</i> (class)	4.6 (0.2–32.4)	1.9 (0.4–15.4)	2.8 (0.2–32.4)	2.9 (0.5–20.8)
<i>Verrucomicrobiae</i> (class)	0.1 (0.0–24.5)	1.1 (0.0–30.9)	0.3 (0.0–30.9)	0.7 (0.0–23.2)
Unclassified sequences derived from Bacteria	4.7 (1.4–13.3) <sup>a</sup>	9.7 (2.2–32.3) <sup>b</sup>	5.9 (1.4–32.3)	8.0 (1.4–31.8) <sup>b</sup>
Alpha diversity	33.5 (17.0–86.0)	28.5 (9.0–55.0)	30.5 (9.0–86.0)	32.0 (12.0–62.0)

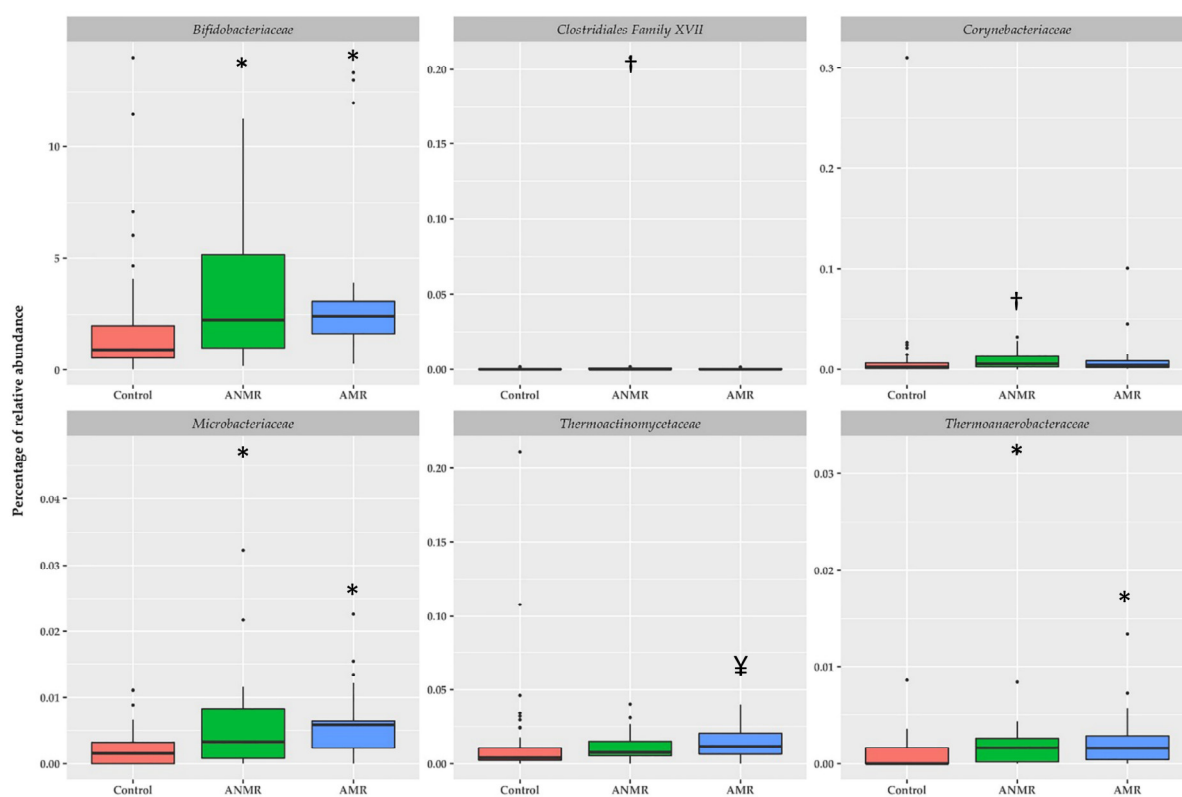
Data are given as median and range. \* *P*-values were obtained from the Mann-Whitney U-test. Labeled medians with identical letters are not significant. Different letters means significant differences ( $P < 0.05$ ) and were calculated using a H Kruskal–Wallis test corrected by Bonferroni post-hoc test. ASD, children with autism spectrum disorders; AMR, children with autism mental regression; ANMR, children with autism non-mental regression. Table 2 shows only the phylum and class abundances with a value higher than 0.1%.

Following quality control, an average of 96,417 (range 25,633–263,373), 229,679 (12,644–587,681) and 223,197 (range 15,611–641,292) reads per sample were obtained for healthy children, children with ANMR, and children with AMR, respectively. Reads were classified into more than 4,000 different taxons. All samples were rarefied to prevent bias due to sampling depth. At phylum level, *Actinobacteria* and *Proteobacteria* were higher in children with ASD compared to healthy group. For the mental regression, ANMR group showed augmented levels in *Actinobacteria* phylum and class compared with the healthy group, whereas children with AMR reported augmented *Proteobacteria* relative abundances compared with the control and ANMR groups. At class level, we found the same differences for *Actinobacteria* class and higher levels for *Bacilli*, *Erysipelotrichi*, and *Gammaproteobacteria* in the comparison of children with ASD and healthy group. Alpha diversity was similar between groups.

Figure 1 shows the bacterial families with higher representation in the intestinal microbiota. Bacillaceae, Bifidobacteriaceae, Corynebacteriaceae, Desulfohalobiaceae, Enterobacteriaceae, Enterococcaceae, Erysipelotrichaceae, Fusobacteriaceae, Microbacteriaceae, and Thermoactinomycetaceae were significantly higher in children with ASD compared to the healthy group. Only Lachnospiraceae showed to be lower in children with ASD in comparison to the healthy group. At family level, the differences between children with ASD and the healthy group were more notorious in relative abundances with values less than 0.1%. Figure 2 shows the specific differences among children with ANMR, AMR and the healthy group. Children with ANMR and AMR had higher levels of Bifidobacteriaceae, Microbacteriaceae, and Thermoanaerobacteraceae compared to the healthy group. Corynebacteriaceae and Clostridiales Family XVII were exclusively higher in children with ANMR, whereas Thermoactinomycetaceae family was significantly increased in children with AMR.



**Figure 1.** Relative abundance of family bacterial taxon in feces of children with ASD and healthy children. Boxplots were generated using the R software utilizing the ggplot2 package, and represent the most important bacterial families ¥  $P < 0.05$  vs control group.



**Figure 2.** Relative abundances of selected bacteria according to family taxon in feces of children with ASD classified by mental regression and healthy children. Boxplots were generated using the R software utilizing the ggplot2 package and represent bacterial families \*  $P < 0.05$  vs. control group, †  $P < 0.05$  vs. control and AMR groups, and ¥  $P < 0.05$  vs. control and ANMR groups using H Kruskal-Wallis test corrected by Bonferroni post-hoc test.

At genus and species levels, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Butyrivibrio*, *Enterococcus*, *Hespellia*, *Prevotella*, *Clostridium bolteae*, and *Clostridium difficile* were significantly higher in children with ASD compared to healthy group. Children with AMR and ANMR had higher levels of *Bifidobacterium* and *Clostridium bolteae* compared to the healthy group, whereas only *Enterococcus* was significantly higher in children with AMR (Table 3).

**Table 3.** Relative abundances of fecal bacteria (genus and species) in children with ASD classified by mental regression and healthy children.

Variables	ASD			Control (n = 57)
	ANMR (n = 30)	AMR (n = 18)	Total (n = 48)	
<i>Akkermansia</i>	0.06 (0.0–24.8)	1.1 (0.0–32.3)	0.30 (0.0–32.3)	0.7 (0.0–24.2)
<i>Alistipes</i>	3.9 (0.0–13.8)	3.8 (0.0–20.0)	3.9 (0.0–20.0)	5.7 (0.0–26.1)
<i>Bacillus</i>	0.03 (0.0–0.1)	0.03 (0.0–0.1)	0.03 (0.0–0.1) *	0.02 (0.0–0.4)
<i>Bacteroides</i>	30.3 (1.1–60.8)	23.2 (4.0–48.4)	28.6 (1.1–60.8)	29.4 (2.4–51.3)
<i>Bifidobacterium</i>	2.2 (0.2–13.8) <sup>a</sup>	2.4 (0.3–14.2) <sup>a</sup>	2.3 (0.2–14.2) *	0.9 (0.0–14.0) <sup>b</sup>
<i>Butyrivibrio</i>	1.0 (0.2–5.3)	1.0 (0.1–4.7)	1.0 (0.1–5.3) *	1.4 (0.2–6.8)
<i>Clostridium</i>	6.1 (3.0–11.7)	5.7 (3.0–16.9)	5.8 (3.0–16.9)	5.4 (1.8–16.9)
<i>Collinsella</i>	0.4 (0.0–4.4)	0.2 (0.0–8.2)	0.4 (0.0–8.2)	0.5 (0.0–5.0)
<i>Desulfovibrio</i>	0.001 (0.0–0.5)	0.002 (0.0–1.3)	0.002 (0.0–1.3)	0.0005 (0.0–0.3)
<i>Enterococcus</i>	0.002 (0.0–0.04) <sup>a</sup>	0.004 (0.0–0.01) <sup>b</sup>	0.004 (0.0–0.04) *	0.001 (0.0–0.04) <sup>a</sup>
<i>Eubacterium</i>	4.0 (0.5–10.9)	2.6 (0.3–8.4)	3.6 (0.3–10.9)	2.6 (0.5–13.5)
<i>Faecalibacterium</i>	11.7 (1.4–22.8)	9.6 (1.8–37.0)	10.7 (1.4–37.0)	11.4 (2.7–37.1)
<i>Hespellia</i>	0.2 (0.0–1.9)	0.2 (0.0–0.7)	0.2 (0.0–1.9) *	0.1 (0.0–0.9)
<i>Lactobacillus</i>	0.05 (0.0–3.5)	0.03 (0.0–0.6)	0.04 (0.0–3.5)	0.03 (0.0–1.0)
<i>Parabacteroides</i>	2.6 (0.0–8.3)	2.1 (0.0–5.5)	2.4 (0.0–8.3)	1.9 (0.0–10.0)
<i>Prevotella</i>	0.3 (0.0–30.2)	0.2 (0.0–11.9)	0.3 (0.0–30.2) *	0.1 (0.0–43.7)
<i>Ruminococcus</i>	3.1 (1.1–10.3)	3.3 (0.9–15.8)	3.1 (0.9–15.8)	3.2 (0.7–26.5)
<i>Veillonella</i>	0.4 (0.1–34.9)	0.6 (0.0–5.8)	0.5 (0.0–34.9)	0.7 (0.0–19.3)
<i>Bacteroides fragilis</i>	0.33 (0.0–9.1)	0.39 (0.0–7.9)	0.35 (0.0–9.1)	0.34 (0.0–32.1)
<i>Bacteroides vulgatus</i>	2.9 (0.0–28.1)	1.2 (0.0–36.7)	1.4 (0.0–36.7)	8.5 (0.0–36.3)
<i>Clostridium bolteae</i>	0.1 (0.0–1.7) <sup>a</sup>	0.1 (0.0–1.2) <sup>a</sup>	0.1 (0.0–1.7) *	0.04 (0.0–1.4) <sup>b</sup>
<i>Clostridium difficile</i>	0.08 (0.0–0.6)	0.04 (0.0–0.6)	0.09 (0.0–0.6) *	0.06 (0.0–0.8)
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	11.3 (1.4–21.9)	9.1 (1.7–36.0)	10.3 (1.4–36.0)	11.3 (2.6–35.7)
<i>Ruminococcus gnavus</i>	0.3 (0.0–4.5)	0.2 (0.0–1.7)	0.3 (0.0–4.5)	0.3 (0.0–7.6)
<i>Ruminococcus torques</i>	0.1 (0.0–0.9)	0.1 (0.0–3.2)	0.1 (0.0–3.2)	0.08 (0.0–5.0)

Data are given as the median and range. \* *P*-values were obtained from the Mann-Whitney U-test. Labeled medians with identical letters are not significant. Different letters means significant differences ( $P < 0.05$ ) and were calculated using a H Kruskal Wallis test corrected by Bonferroni post-hoc test. ASD, children with autism spectrum disorders; AMR, children with autism mental regression; ANMR, children with autism non-mental regression. Table three shows only the important genus and species abundances.

Changes in intestinal microbiota might be related to food patterns and nutrient intakes. Hence, principal component analyses (PCA) were performed with bacterial and food consumption variables. In healthy children, component one was defined for fish, red meat and processed cold meat variables, those that were related inversely with cereal and milk consumption. Bacterial variables in component one were *Clostridium difficile* and *Butyrivibrio*, which correlated inversely with *Prevotella*. Children with ASD showed different nutritional variables related to component one, cakes and pastry with red and processed cold meat, as well as fish consumption were associated negatively with vegetables consumption. Finally, *Hespellia* was the only bacterial variable reported in component one.

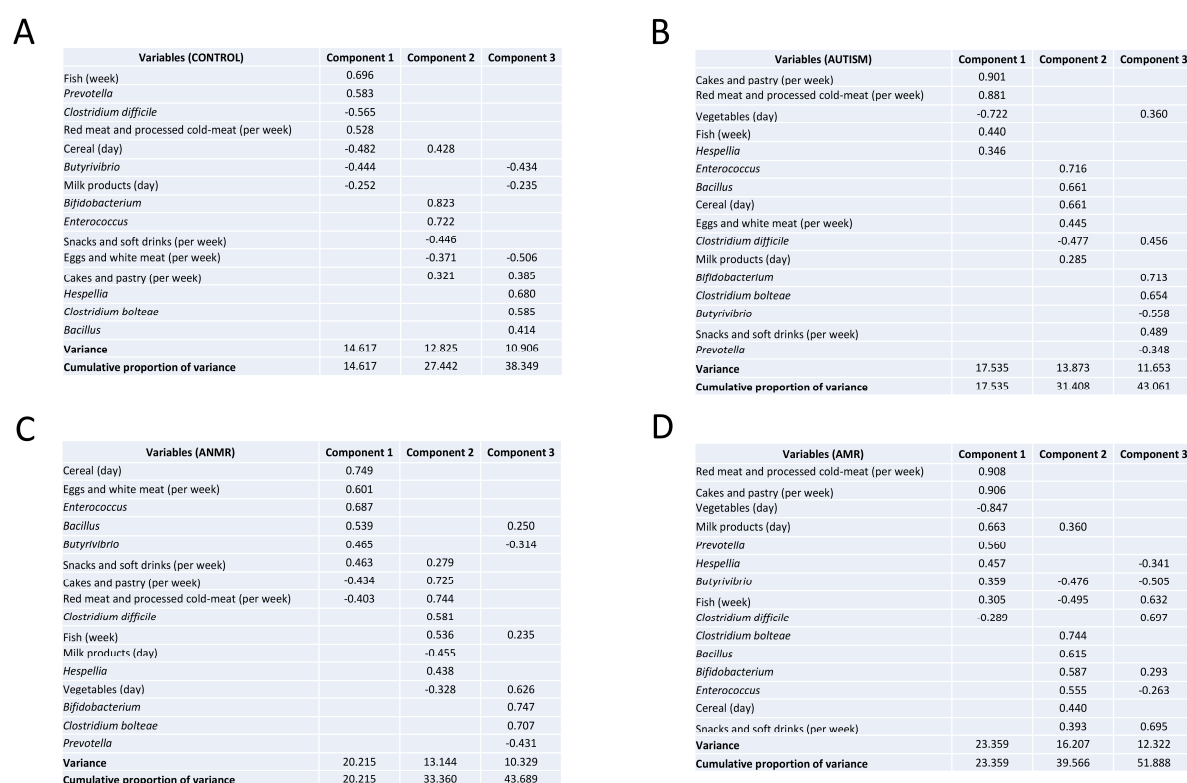


Concerning children with AMR, we observed that variables in component one were similar to children with ASD, whereas children with ANMR had dissimilar variables, such as cereal and eggs and white meat consumption, and *Enterococcus*, *Bacillus* and *Butyrivibrio*.

Component two in healthy children included bacterial variables related in a positive way; we found here *Bifidobacterium* and *Enterococcus*. Food variables were snacks, cakes and pastry consumption, which correlated negatively with eggs and white meat. Finally, the component three was demarcated only through bacterial variables; here *Hespellia*, *Clostridium bolteae*, and *Bacillus* are presented. Children with ASD had a component two with *Enterococcus* and *Bacillus* that correlated inversely with *Clostridium difficile*, food variables were cereal, eggs and white meat, and milk products. Component three in children with ASD had a mix between bacterial variables and snack and soft drink consumption, here *Bifidobacterium*, *Clostridium bolteae*, and snack and soft drink consumption were correlated negatively with *Butyrivibrio* and *Prevotella*.

Component two in children with ANMR was defined by *Clostridium difficile*, *Hespellia* and fish consumption correlated negatively with vegetables and milk products consumption, and, component three was exclusively determined by bacterial variables, here *Bifidobacterium* and *Clostridium bolteae* were related negatively with *Prevotella*.

Finally, component two in children with AMR was defined through bacterial variables; *Clostridium bolteae*, *Bacillus*, *Bifidobacterium* and *Enterococcus* correlated positively with cereal and snacks and soft drinks consumption (Figure 3).



**Figure 3.** Principal component analysis between intestinal microbiota and food consumption in children with ASD and healthy children. Extraction of the initial set of uncorrelated components was accomplished with the principal factor method and then the orthogonal rotation of components was used to facilitate interpretation. Factor loading was used to interpret the factor structure. Loadings are equivalent to Pearson correlation coefficients, and a higher loading indicates a stronger relation between a factor and an observed variable. Strong loading was defined as a value  $\geq 0.6$ ; moderate as 0.4–0.59 and low as  $<0.4$ . (A) Control group, (B) Children with ASD, (C) Children with ANMR, (D) Children with AMR. ASD, children with autism spectrum disorders; AMR, children with autism mental regression; ANMR, children with autism non-mental regression.

#### 4. Discussion

The present study analyzes the fecal microbiota in children with ASD, classified according to mental regression phenotypes using a metagenomic approach. The major findings were that fecal samples from children with ASD exhibited several differences compared to a healthy group, especially in *Actinobacteria* and *Proteobacteria*, as these two phyla were significantly higher in children with ASD. In addition, *Actinobacteria* class, *Bacilli*, *Erysipelotrichi*, and *Gammaproteobacteria* levels were increased in children with ASD. Moreover, *Bacillaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Desulfohalobiaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Microbacteriaceae*, and *Thermoactinomycetaceae*, and *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Butyrivibrio*, *Enterococcus*, *Hespellia*, *Prevotella*, *Clostridium boltea*, and *Clostridium difficile* were significantly augmented in children with ASD. When children with ASD were divided according MR, *Corynebacteriaceae* and *Clostridiales* Family XVII were solely higher in children with ANMR, whereas *Proteobacteria*, *Thermoactinomycetaceae* and *Enterococcus* abundances were exclusively higher in children with AMR. These findings support previous studies reporting changes in intestinal microbiota from children with ASD, and add new information regarding mental regression, a new variable in ASD that could influence the intestinal microbiota profile.

Patients with ASD who present gastrointestinal symptoms might display significant behavioral manifestations, such as anxiety, self-injury and aggression [11]. We mentioned earlier that gut microorganisms can affect brain functions through the vagus nerve [31], and accumulating evidence demonstrates that this gut microbiota is directly or indirectly associated with ASD symptoms, in part by influencing the immune system and metabolism [51,52]. Changes in the composition of gut microorganisms can affect both the enteric nervous system and the central nervous system (CNS), thereby indicating the existence of a microbiota—gut—brain axis [31].

*Actinobacteria* is an important phylum exhibiting differences between children with ASD compared with healthy ones. Four specific studies [18,21,27,53] have reported decreased *Actinobacteria* in children with ASD, whereas a study in 2005 showed no differences [54]. Opposite to that reported in previous work, our study showed an increase in that phylum. According to mental regression, children with ANMR had significantly higher *Actinobacteria* in comparison with the healthy group. *Bifidobacterium* represents a genus within the *Actinobacteria* phylum specially found in infants during lactation. Bifidobacteria are early colonizers of gut microbiota, and have reported properties in the metabolism of dietary components, and even effects over maturation of the immune system [55,56]. In addition, consumption of yogurt and other fermented dairy products is associated with an increase of fecal bifidobacteria [57–59]. Children with ASD, ANMR and AMR had significantly higher amounts of *Bifidobacterium* in comparison to the healthy group, which may be related to a high consumption of dairy products.

In *Akkermansia* genus, we found *A. muciniphila* an important bacterium able to prevent the development of obesity in animal models. A pasteurized version of *A. muciniphila* was capable to reduce fat mass development, insulin resistance, and dyslipidemia in mice; moreover, the pasteurized bacterium modulated both the host urinary metabolome and intestinal energy absorption [60]. *Akkermansia* genus was not different in none comparison in our studied children. In fact, *Akkermansia* genus was similar in all groups, showing a wide variation between the evaluated samples. The results in this genus are contradictory; Kang et al. [61] found similar results with our study, unchanged genus in the comparison with children with ASD. De Angelis et al. [53] reported increased amount in *Akkermansia*, and in contrast, Wang et al. [18] found the opposite.

*Prevotella* is a large genus that includes almost 40 different species with a vast genomic diversity. It has been suggested that *Prevotella* is a beneficial bacteria as it is associated with a plant-rich diet, however it is also linked to chronic inflammatory conditions, such as arthritis and mucosal and systemic T-cell activation in untreated human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection [62,63]. The case of *Prevotella* is similar to the previous genus *Akkermansia*, unchanged relative abundance in Wang study [18], decreased levels in Kang et al. [61] study and finally, augmented levels in De Angelis et al. [53] study. For *Prevotella*, we report a significant increase in children with ASD.

Changes in the gut microbiota associated with ASD might be related to an increased permeability of the intestinal tract of individuals, referred to as a “leaky gut” [64], but this factor is related directly with other factors, such as, immune response. Previous studies have demonstrated that ASD animal models present defects in the gastrointestinal barrier, resulting in the entry of the toxins and bacterial products into the bloodstream, which influence brain function [14,65]. These arguments were supported with the idea of level changes in some immune cells and cytokines, such as, interleukin (IL)-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$ , among others. However, plasma cytokine levels in our children with ASD compared to the levels in the healthy control group, only showed differences in the nerve growth factor, but the aforementioned cytokines were not significantly different [22]. Although microbiota changes are related with immunological responses, profound differences require more variables to explain the present variance. Accordingly, Lovene et al. found that in few ASD-positive samples, with low-mild augmented calprotectin values, no correlation was found with either increase or decrease of bacterial/yeast species. A correlation was, however, present with disease degree (CARS score), thus possibly confirming that gut inflammation also could participate to gut discomfort ending in influence on behavior [24].

An association between high levels of *Sutterella* species and gastrointestinal disturbances in children with ASD was reported. These findings in ileal and cecal biopsy samples have demonstrated that *Sutterella*, a bacterium with a low abundance in the microbiota, is a major component of the microbiota in over half of children with ASD and gastrointestinal dysfunction and is absent in healthy children with only gastrointestinal dysfunction [66]. Microbes are different from the places where they are extracted [67], in our study *Sutterella* was not detected in none analyzed group. This might be related to the usual Mediterranean diet consumed in Spain compared to other countries.

Maternal obesity during pregnancy and gestational diabetes alter the gut microbiota and might be associated with ASD in humans [68]. As shown by Buffington et al., a maternal high-fat diet induces dysbiosis and autism-like phenotypes in mice, and *Lactobacillus reuteri* restores these alternations [69]. Diet might have a tremendous influence in the development of ASD. However, a systematic review concluded that the evidence to support a gluten-free, casein-free diet is limited and weak, considering that dietary restrictions might be responsible for further social withdrawal and integration, in addition to potential adverse clinical effects [70]. Elimination diets for ASD patients should only be initiated after reaching a diagnosis of an adverse food reaction. On the other hand, the administration of probiotics can be useful for restoring the microbial balance in the intestine and ameliorating gastrointestinal symptoms. Some evidence has accumulated regarding the possible role of probiotics in modulating some neurological symptoms [71]. Because ASD patients presented GI dysbiosis [20,21], which may exacerbate the disease [19]. However, in our study, alpha diversity was not significantly different in all tested groups.

We have included in our study, a dietary dimension, transforming the consumed portions with the recommendations of Spanish Society of Community Nutrition (SENC) Food Guide Pyramid in scholar age to determine or assess potential relationships between microbiota and diet [45]. The profile in healthy children was determined by consumption of fish, red meat and processed cold meat, cereal and milk products, whereas children with ASD have cakes and pastry with red meat and processed cold meat, and fish consumption, which related negatively with vegetables consumption. Moreover, bacterial variables in component one, were *Clostridium difficile* and *Butirivibrio*, which correlated inversely with *Prevotella* in healthy children. In contrast, in children with ASD *Hespella* was the only bacterial variable reported in component one. According to mental regression, children with ANMR seem to exhibit a microbiota profile typical of children with ASD than AMR group; however further analyses are needed to confirm these results.

A limitation of the present study according to microbiota was the biological material analyzed; we just were able to evaluate fecal samples, and others, such as, buccal samples, urine samples or saliva will be required to connect these findings with an overall “microbiome” view. To better understand the role of the microbiota and the interplay between nutrition and the microbiota in ASD, future studies should systematically investigate the role of food and nutrition in the microbial

composition of children with ASD and stress the importance of analyzing the microbiota in the context of diet and medication [72]. In addition, multicomponent analyses including microbiota patterns, genetic and metabolomics approaches, and nutrition assessment are required to understand how children with ASD can exhibit different phenotypes and behaviors.

## 5. Conclusions

In conclusion, several differences between children with ASD compared with healthy group were detected; *Actinobacteria* and *Proteobacteria* at phylum level, and *Actinobacteria*, *Bacilli*, *Erysipelotrichi*, and *Gammaproteobacteria* at class level were higher in children with ASD. Additionally, *Proteobacteria* levels were augmented exclusively in children with AMR. Mixed bacterial and nutritional variables showed differential patterns in children with ASD, ANMR and AMR. Furthermore, *Corynebacteriaceae* and *Clostridiales Family XVII* were solely higher in children with ANMR, whereas *Proteobacteria*, *Thermoactinomycetaceae* and *Enterococcus* abundances were exclusively higher in children with AMR. Further analyses mixing omics technologies, diet questionnaires and inflammation pathways are needed in larger ASD cohorts to confirm the results of the present study in terms of the population of children in Spain.

**Author Contributions:** A.G.-F., M.G.-C., and J.P.-N. contributed to the study conception and study design. A.G.-F., K.F.-R., and M.J.-T. collected all the data, acquired the behavioral data, and assisted with regulatory responsibilities. N.C., F.G. and P.S.U. carried out the analysis. J.P.-D. and F.J.R.O. realized statistical analysis. J.P.D., A.G. and M.G.-C. were responsible for the interpretation of the data, as well as drafting the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

**Funding:** This study was supported by the FUNDACIÓ AGRUPACIÓ Àmbit de la Infància, 404 Research Grant INVEST from the Spanish Society of Pediatrics and Red de Salud Materno Infantil (RED SAMID). The funding bodies did not have any role in the design, collection, analyses, or interpretation of data or in writing the manuscript.

**Acknowledgments:** Julio Plaza-Diaz is part of University of Granada, Plan Propio de Investigación 2016, Excellence actions: Units of Excellence; Unit of Excellence on Exercise and Health (UCEES). Patricio Solis-Urra was supported by a grant from CONICYT/BECAS Chile/72180543.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Gilbert, J.A.; Krajmalnik-Brown, R.; Porazinska, D.L.; Weiss, S.J.; Knight, R. Toward effective probiotics for autism and other neurodevelopmental disorders. *Cell* **2013**, *155*, 1446–1448, doi:10.1016/j.cell.2013.11.035.
2. Plaza-Diaz, J.; Ruiz-Ojeda, F.J.; Vilchez-Padial, L.M.; Gil, A. Evidence of the Anti-Inflammatory Effects of Probiotics and Synbiotics in Intestinal Chronic Diseases. *Nutrients* **2017**, *9*, 555, doi:10.3390/nu9060555.
3. Plaza-Diaz, J.; Ruiz-Ojeda, F.J.; Gil-Campos, M.; Gil, A. Immune-Mediated Mechanisms of Action of Probiotics and Synbiotics in Treating Pediatric Intestinal Diseases. *Nutrients* **2018**, *10*, doi:10.3390/nu10010042.
4. de la Fuente-Nunez, C.; Meneguetti, B.T.; Franco, O.L.; Lu, T.K. Neuromicrobiology: How Microbes Influence the Brain. *ACS Chem. Neurosci.* **2018**, *9*, 141–150, doi:10.1021/acschemneuro.7b00373.
5. Yang, Y.; Tian, J.; Yang, B. Targeting gut microbiome: A novel and potential therapy for autism. *Life Sci.* **2018**, *194*, 111–119, doi:10.1016/j.lfs.2017.12.027.
6. Baio, J.; Wiggins, L.; Christensen, D.L.; Maenner, M.J.; Daniels, J.; Warren, Z.; Kurzius-Spencer, M.; Zahorodny, W.; Robinson Rosenberg, C.; White, T.; et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years—Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *Morb. Mortal. Wkly Rep. Surveill. Summ.* **2018**, *67*, 1–23, doi:10.15585/mmwr.ss6706a1.
7. Morales-Hidalgo, P.; Roige-Castellvi, J.; Hernandez-Martinez, C.; Voltas, N.; Canals, J. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Spanish School-Age Children. *J. Autism Dev. Disord.* **2018**, *48*, 3176–3190, doi:10.1007/s10803-018-3581-2.
8. Li, Q.; Zhou, J.M. The microbiota-gut-brain axis and its potential therapeutic role in autism spectrum disorder. *Neuroscience* **2016**, *324*, 131–139, doi:10.1016/j.neuroscience.2016.03.013.

9. Schieve, L.A.; Gonzalez, V.; Boulet, S.L.; Visser, S.N.; Rice, C.E.; Van Naarden Braun, K.; Boyle, C.A. Concurrent medical conditions and health care use and needs among children with learning and behavioral developmental disabilities, National Health Interview Survey, 2006–2010. *Res. Dev. Disabil.* **2012**, *33*, 467–476, doi:10.1016/j.ridd.2011.10.008.
10. Kohane, I.S.; McMurry, A.; Weber, G.; MacFadden, D.; Rappaport, L.; Kunkel, L.; Bickel, J.; Wattanasin, N.; Spence, S.; Murphy, S.; et al. The co-morbidity burden of children and young adults with autism spectrum disorders. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e33224, doi:10.1371/journal.pone.0033224.
11. Buie, T.; Fuchs, G.J., 3rd; Furuta, G.T.; Kooros, K.; Levy, J.; Lewis, J.D.; Wershil, B.K.; Winter, H. Recommendations for evaluation and treatment of common gastrointestinal problems in children with ASDs. *Pediatrics* **2010**, *125* (Suppl. 1), S19–S29, doi:10.1542/peds.2009-1878D.
12. Emanuele, E.; Orsi, P.; Boso, M.; Broglia, D.; Brondino, N.; Barale, F.; di Nemi, S.U.; Politi, P. Low-grade endotoxemia in patients with severe autism. *Neurosci. Lett.* **2010**, *471*, 162–165, doi:10.1016/j.neulet.2010.01.033.
13. Ding, H.T.; Taur, Y.; Walkup, J.T. Gut Microbiota and Autism: Key Concepts and Findings. *J. Autism Dev. Disord.* **2017**, *47*, 480–489, doi:10.1007/s10803-016-2960-9.
14. Hsiao, E.Y.; McBride, S.W.; Hsien, S.; Sharon, G.; Hyde, E.R.; McCue, T.; Codelli, J.A.; Chow, J.; Reisman, S.E.; Petrosino, J.F.; et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* **2013**, *155*, 1451–1463, doi:10.1016/j.cell.2013.11.024.
15. Foley, K.A.; MacFabe, D.F.; Kavaliers, M.; Ossenkopp, K.P. Sexually dimorphic effects of prenatal exposure to lipopolysaccharide, and prenatal and postnatal exposure to propionic acid, on acoustic startle response and prepulse inhibition in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorders. *Behav. Brain Res.* **2015**, *278*, 244–256, doi:10.1016/j.bbr.2014.09.032.
16. O'Mahony, S.M.; Clarke, G.; Borre, Y.E.; Dinan, T.G.; Cryan, J.F. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav. Brain Res.* **2015**, *277*, 32–48, doi:10.1016/j.bbr.2014.07.027.
17. Hornig, M. The role of microbes and autoimmunity in the pathogenesis of neuropsychiatric illness. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2013**, *25*, 488–495, doi:10.1097/BOR.0b013e32836208de.
18. Wang, L.; Christophersen, C.T.; Soric, M.J.; Gerber, J.P.; Angley, M.T.; Conlon, M.A. Low relative abundances of the mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 6718–6721, doi:10.1128/AEM.05212-11.
19. Sandler, R.H.; Finegold, S.M.; Bolte, E.R.; Buchanan, C.P.; Maxwell, A.P.; Vaisanen, M.L.; Nelson, M.N.; Wexler, H.M. Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *J. Child Neurol.* **2000**, *15*, 429–435, doi:10.1177/088307380001500701.
20. Finegold, S.M. Therapy and epidemiology of autism--clostridial spores as key elements. *Med. Hypotheses* **2008**, *70*, 508–511, doi:10.1016/j.mehy.2007.07.019.
21. Finegold, S.M.; Dowd, S.E.; Gontcharova, V.; Liu, C.; Henley, K.E.; Wolcott, R.D.; Youn, E.; Summanen, P.H.; Granpeesheh, D.; Dixon, D.; et al. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe* **2010**, *16*, 444–453, doi:10.1016/j.anaerobe.2010.06.008.
22. Gomez-Fernandez, A.; de la Torre-Aguilar, M.J.; Gil-Campos, M.; Flores-Rojas, K.; Cruz-Rico, M.D.; Martin-Borreguero, P.; Perez-Navero, J.L. Children With Autism Spectrum Disorder With Regression Exhibit a Different Profile in Plasma Cytokines and Adhesion Molecules Compared to Children Without Such Regression. *Front. Pediatr.* **2018**, *6*, 264, doi:10.3389/fped.2018.00264.
23. Kern, J.K.; Geier, D.A.; Geier, M.R. Evaluation of regression in autism spectrum disorder based on parental reports. *N. Am. J. Med. Sci.* **2014**, *6*, 41–47, doi:10.4103/1947-2714.125867.
24. Iovene, M.R.; Bombace, F.; Maresca, R.; Sapone, A.; Iardino, P.; Picardi, A.; Marotta, R.; Schiraldi, C.; Siniscalco, D.; Serra, N.; et al. Intestinal Dysbiosis and Yeast Isolation in Stool of Subjects with Autism Spectrum Disorders. *Mycopathologia* **2017**, *182*, 349–363, doi:10.1007/s11046-016-0068-6.
25. Carding, S.; Verbeke, K.; Vipond, D.T.; Corfe, B.M.; Owen, L.J. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2015**, *26*, 26191, doi:10.3402/mehd.v26.26191.
26. Buie, T. Potential Etiologic Factors of Microbiome Disruption in Autism. *Clin. Ther.* **2015**, *37*, 976–983, doi:10.1016/j.clinthera.2015.04.001.
27. Adams, J.B.; Johansen, L.J.; Powell, L.D.; Quig, D.; Rubin, R.A. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol.* **2011**, *11*, 22, doi:10.1186/1471-230X-11-22.

28. Mulak, A.; Bonaz, B. Irritable bowel syndrome: A model of the brain-gut interactions. *Med. Sci. Monit.* **2004**, *10*, RA55–62.
29. Forsythe, P.; Bienenstock, J.; Kunze, W.A. Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2014**, *817*, 115–133, doi:10.1007/978-1-4939-0897-4\_5.
30. Bravo, J.A.; Forsythe, P.; Chew, M.V.; Escaravage, E.; Savignac, H.M.; Dinan, T.G.; Bienenstock, J.; Cryan, J.F. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 16050–16055, doi:10.1073/pnas.1102999108.
31. Zhu, X.; Han, Y.; Du, J.; Liu, R.; Jin, K.; Yi, W. Microbiota-gut-brain axis and the central nervous system. *Oncotarget* **2017**, *8*, 53829–53838, doi:10.18632/oncotarget.17754.
32. Araque, A.; Carmignoto, G.; Haydon, P.G.; Oliet, S.H.; Robitaille, R.; Volterra, A. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* **2014**, *81*, 728–739, doi:10.1016/j.neuron.2014.02.007.
33. Chung, W.; Choi, S.Y.; Lee, E.; Park, H.; Kang, J.; Park, H.; Choi, Y.; Lee, D.; Park, S.G.; Kim, R.; et al. Social deficits in IRSp53 mutant mice improved by NMDAR and mGluR5 suppression. *Nat. Neurosci.* **2015**, *18*, 435–443, doi:10.1038/nn.3927.
34. Erny, D.; Hrabé de Angelis, A.L.; Jaitin, D.; Wieghofer, P.; Staszewski, O.; David, E.; Keren-Shaul, H.; Muhlaker, T.; Jakobshagen, K.; Buch, T.; et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat. Neurosci.* **2015**, *18*, 965–977, doi:10.1038/nn.4030.
35. Morgan, J.T.; Chana, G.; Abramson, I.; Semendeferi, K.; Courchesne, E.; Everall, I.P. Abnormal microglial-neuronal spatial organization in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Brain Res.* **2012**, *1456*, 72–81, doi:10.1016/j.brainres.2012.03.036.
36. Edmonson, C.; Ziats, M.N.; Rennert, O.M. Altered glial marker expression in autistic post-mortem prefrontal cortex and cerebellum. *Mol. Autism* **2014**, *5*, 3, doi:10.1186/2040-2392-5-3.
37. Suzuki, K.; Sugihara, G.; Ouchi, Y.; Nakamura, K.; Futatsubashi, M.; Takebayashi, K.; Yoshihara, Y.; Omata, K.; Matsumoto, K.; Tsuchiya, K.J.; et al. Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. *JAMA Psychiatry* **2013**, *70*, 49–58, doi:10.1001/jamapsychiatry.2013.272.
38. Sharon, G.; Sampson, T.R.; Geschwind, D.H.; Mazmanian, S.K. The Central Nervous System and the Gut Microbiome. *Cell* **2016**, *167*, 915–932, doi:10.1016/j.cell.2016.10.027.
39. Lu, J.; Lu, L.; Yu, Y.; Cluette-Brown, J.; Martin, C.R.; Claud, E.C. Effects of Intestinal Microbiota on Brain Development in Humanized Gnotobiotic Mice. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5443, doi:10.1038/s41598-018-23692-w.
40. Bjorklund, G. The role of zinc and copper in autism spectrum disorders. *Acta Neurobiol. Exp.* **2013**, *73*, 225–236.
41. Ong, I.M.; Gonzalez, J.G.; McIlwain, S.J.; Sawin, E.A.; Schoen, A.J.; Adluru, N.; Alexander, A.L.; Yu, J.J. Gut microbiome populations are associated with structure-specific changes in white matter architecture. *Transl. Psychiatry* **2018**, *8*, 6, doi:10.1038/s41398-017-0022-5.
42. World Health Organization. The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders: Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1992; Volume 1.
43. American Psychiatric Pub. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®)*; American Psychiatric Pub: Washington, DC, USA, 2013.
44. Kim, S.H.; Lord, C. New autism diagnostic interview-revised algorithms for toddlers and young preschoolers from 12 to 47 months of age. *J. Autism Dev. Disord.* **2012**, *42*, 82–93, doi:10.1007/s10803-011-1213-1.
45. Aranceta Bartrina, J. Role of gastronomy and new technologies in shaping a healthy diet. *Nutricion Hospitalaria* **2018**, *35*, 3–9, doi:10.20960/nh.2118.
46. Herlemann, D.P.; Labrenz, M.; Jurgens, K.; Bertilsson, S.; Waniek, J.J.; Andersson, A.F. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* **2011**, *5*, 1571–1579, doi:10.1038/ismej.2011.41.
47. Schloss, P.D.; Westcott, S.L.; Ryabin, T.; Hall, J.R.; Hartmann, M.; Hollister, E.B.; Lesniewski, R.A.; Oakley, B.B.; Parks, D.H.; Robinson, C.J.; et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 7537–7541, doi:10.1128/AEM.01541-09.
48. Meyer, F.; Paarmann, D.; D'Souza, M.; Olson, R.; Glass, E.M.; Kubal, M.; Paczian, T.; Rodriguez, A.; Stevens, R.; Wilke, A.; et al. The metagenomics RAST server—A public resource for the automatic

- phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinform.* **2008**, *9*, 386, doi:10.1186/1471-2105-9-386.
49. Marques, R.C.; Bernardi, J.V.; Dorea, J.G.; Bastos, W.R.; Malm, O. Principal component analysis and discrimination of variables associated with pre- and post-natal exposure to mercury. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2008**, *211*, 606–614, doi:10.1016/j.ijheh.2007.09.008.
  50. Weiss, R.; Dziura, J.; Burgert, T.S.; Tamborlane, W.V.; Taksali, S.E.; Yeckel, C.W.; Allen, K.; Lopes, M.; Savoye, M.; Morrison, J.; et al. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 2362–2374, doi:10.1056/NEJMoa031049.
  51. De Angelis, M.; Francavilla, R.; Piccolo, M.; De Giacomo, A.; Gobbetti, M. Autism spectrum disorders and intestinal microbiota. *Gut Microbes* **2015**, *6*, 207–213, doi:10.1080/19490976.2015.1035855.
  52. Mead, J.; Ashwood, P. Evidence supporting an altered immune response in ASD. *Immunol. Lett.* **2015**, *163*, 49–55, doi:10.1016/j.imlet.2014.11.006.
  53. De Angelis, M.; Piccolo, M.; Vannini, L.; Siragusa, S.; De Giacomo, A.; Serrazanetti, D.I.; Cristofori, F.; Guerzoni, M.E.; Gobbetti, M.; Francavilla, R. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e76993, doi:10.1371/journal.pone.0076993.
  54. Parracho, H.M.; Bingham, M.O.; Gibson, G.R.; McCartney, A.L. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *J. Med. Microbiol.* **2005**, *54*, 987–991, doi:10.1099/jmm.0.46101-0.
  55. Ruiz, L.; Delgado, S.; Ruas-Madiedo, P.; Sanchez, B.; Margolles, A. Bifidobacteria and Their Molecular Communication with the Immune System. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2345, doi:10.3389/fmicb.2017.02345.
  56. Bermudez-Brito, M.; Plaza-Diaz, J.; Munoz-Quezada, S.; Gomez-Llorente, C.; Gil, A. Probiotic mechanisms of action. *Ann. Nutr. Metab.* **2012**, *61*, 160–174, doi:10.1159/000342079.
  57. Shiby, V.K.; Mishra, H.N. Fermented milks and milk products as functional foods—A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2013**, *53*, 482–496, doi:10.1080/10408398.2010.547398.
  58. Palaria, A.; Johnson-Kanda, I.; O'Sullivan, D.J. Effect of a synbiotic yogurt on levels of fecal bifidobacteria, clostridia, and enterobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 933–940, doi:10.1128/AEM.05848-11.
  59. Tanaka, Y.; Takami, K.; Nishijima, T.; Aoki, R.; Mawatari, T.; Ikeda, T. Short- and long-term dynamics in the intestinal microbiota following ingestion of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* GCL2505. *Biosci. Microbiota Food Health* **2015**, *34*, 77–85, doi:10.12938/bmfh.2015-001.
  60. Plovier, H.; Everard, A.; Druart, C.; Depommier, C.; Van Hul, M.; Geurts, L.; Chilloux, J.; Ottman, N.; Duparc, T.; Lichtenstein, L.; et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 107–113, doi:10.1038/nm.4236.
  61. Kang, D.W.; Park, J.G.; Ilhan, Z.E.; Wallstrom, G.; Labaer, J.; Adams, J.B.; Krajmalnik-Brown, R. Reduced incidence of *Prevotella* and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e68322, doi:10.1371/journal.pone.0068322.
  62. Ley, R.E. Gut microbiota in 2015: *Prevotella* in the gut: Choose carefully. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *13*, 69–70, doi:10.1038/nrgastro.2016.4.
  63. Kovatcheva-Datchary, P.; Nilsson, A.; Akrami, R.; Lee, Y.S.; De Vadder, F.; Arora, T.; Hallen, A.; Martens, E.; Bjorck, I.; Backhed, F. Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell Metab.* **2015**, *22*, 971–982, doi:10.1016/j.cmet.2015.10.001.
  64. Quigley, E.M. Leaky gut—Concept or clinical entity? *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2016**, *32*, 74–79, doi:10.1097/MOG.0000000000000243.
  65. Onore, C.; Careaga, M.; Ashwood, P. The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain Behav. Immunity* **2012**, *26*, 383–392, doi:10.1016/j.bbi.2011.08.007.
  66. Williams, B.L.; Hornig, M.; Parekh, T.; Lipkin, W.I. Application of novel PCR-based methods for detection, quantitation, and phylogenetic characterization of *Sutterella* species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances. *mBio* **2012**, *3*, doi:10.1128/mBio.00261-11.
  67. Dethlefsen, L.; McFall-Ngai, M.; Relman, D.A. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* **2007**, *449*, 811–818, doi:10.1038/nature06245.
  68. Connolly, N.; Anixt, J.; Manning, P.; Ping, I.L.D.; Marsolo, K.A.; Bowers, K. Maternal metabolic risk factors for autism spectrum disorder—An analysis of electronic medical records and linked birth data. *Autism Res.* **2016**, *9*, 829–837, doi:10.1002/aur.1586.

69. Buffington, S.A.; Di Prisco, G.V.; Auchtung, T.A.; Ajami, N.J.; Petrosino, J.F.; Costa-Mattioli, M. Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. *Cell* **2016**, *165*, 1762–1775, doi:10.1016/j.cell.2016.06.001.
70. Mari-Bauset, S.; Zazpe, I.; Mari-Sanchis, A.; Llopis-Gonzalez, A.; Morales-Suarez-Varela, M. Evidence of the gluten-free and casein-free diet in autism spectrum disorders: A systematic review. *J. Child Neurol.* **2014**, *29*, 1718–1727, doi:10.1177/0883073814531330.
71. Patusco, R.; Ziegler, J. Role of Probiotics in Managing Gastrointestinal Dysfunction in Children with Autism Spectrum Disorder: An Update for Practitioners. *Adv. Nutr.* **2018**, *9*, 637–650, doi:10.1093/advances/nmy031.
72. Berding, K.; Donovan, S.M. Microbiome and nutrition in autism spectrum disorder: Current knowledge and research needs. *Nutr. Rev.* **2016**, *74*, 723–736, doi:10.1093/nutrit/nuw048.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).





# Metabolic profiling in children with autism spectrum disorder with and without mental regression: preliminary results from a cross-sectional case–control study

O. D. Rangel-Huerta<sup>1,2</sup> · A. Gomez-Fernández<sup>3</sup> · M. J. de la Torre-Aguilar<sup>3</sup> · A. Gil<sup>4,5</sup> · J. L. Perez-Navero<sup>3</sup> · K. Flores-Rojas<sup>3,6</sup> · P. Martín-Borreguero<sup>7</sup> · M. Gil-Campos<sup>3,6</sup>

Received: 22 January 2019 / Accepted: 20 June 2019  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

## Abstract

**Introduction** It is challenging to establish the mechanisms involved in the variety of well-defined clinical phenotypes in autism spectrum disorder (ASD) and the pathways involved in their pathogenesis.

**Objectives** The aim of the present study was to evaluate the metabolomic profiles of children with ASD subclassified by mental regression (AR) phenotype and with no regression (ANR).

**Methods** The present study was a cross-sectional case–control study. Thirty children aged 2–6 years with ASD were included: 15 with ANR and 15 with AR. In addition, a control group of 30 normally developing children was selected and matched to the ASD group by sex and age. Plasma samples were analyzed with a metabolomics single platform methodology based on liquid chromatography-mass spectrometry. Univariate and multivariate analysis, including orthogonal partial least squares-discriminant analysis modeling and Shared-and-Unique-Structures plots, were performed using MetaboAnalyst 4.0 and SIMCA-P 15. The primary endpoint was the metabolic signature profiling among healthy children and autistic children and their subgroups.

**Results** Metabolomic profiles of 30 healthy children, 15 ANR and 15 AR were compared. Several differences between healthy children and children with ASD were detected, involving mainly amino acid, lipid and nicotinamide metabolism. Furthermore, we report subtle differences between the ANR and AR groups.

**Conclusions** In this study, we report, for the first time, the plasmatic metabolomic profiles of children with ASD, including two different phenotypes based on mental regression status. The use of a liquid chromatography-mass spectrometry platform approach for metabolomics in ASD children using plasma appears to be very efficient and adds further support to previous findings in urine. Furthermore, the present study documents several changes related to amino acid, NAD<sup>+</sup> and lipid metabolism that, in some cases, such as arginine and glutamate pathway alterations, seem to be associated with the AR phenotype. Further targeted analyses are needed in a larger cohort to validate the results presented herein.

**Keywords** Autism spectrum disorders · Metabolomics · Metabolic profiling · Mental regression

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11306-019-1562-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ M. Gil-Campos  
mercedes\_gil\_campos@yahoo.es

<sup>1</sup> Department of Nutrition, University of Oslo, Oslo, Norway

<sup>2</sup> Norwegian Veterinary Institute, Oslo, Norway

<sup>3</sup> Department of Pediatrics, Reina Sofia University Hospital, University of Córdoba, IMIBIC, Córdoba, Spain

<sup>4</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology II, Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix”, Centre for Biomedical Research, University of Granada, Granada, Spain

<sup>5</sup> CIBEROBN, Madrid, Spain

<sup>6</sup> Paediatric Metabolism Unit, CIBEROBN, Madrid, Spain

<sup>7</sup> Paediatric Mental Unit, Reina Sofia University Hospital, Córdoba, Spain

## 1 Background

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by persistent deficits in social communication and social interaction across multiple contexts with repetitive and restricted patterns of behaviors, activities, and interests (American Psychiatric Publishing 2013). There is a large heterogeneous spectrum of features and a wide range of medical comorbidities. The American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical Manual, Fifth Edition (DSM-5), established the criteria for ASD covering two domains, i.e., social communication difficulties and repetitive and restricted behaviors, and includes abnormal sensory responses as a cardinal symptom (Howes et al. 2018). Symptoms must be present in early development of ASD, but the age of onset and its evolution, i.e., with or without mental regression, varies considerably. There are phenotypes in which some children undergo normal neurodevelopment and then regress in their developmental milestones. Metabolic alterations can underlie several comorbidities associated with ASD, such as seizures and sleep disorders and could contribute to autism severity (Altieri et al. 2011; Gabriele et al. 2014; Gevi et al. 2016).

The diagnosis of ASD is based on reported and observed behavior in keeping with diagnostic classification systems supported by test to exclude other explanations of the behaviors. Therefore, it is difficult to establish the variety of well-defined phenotypes in autism disorders and the pathways involved in their pathogenesis. Therefore, novel techniques, such as metabolomic profiling, can contribute to this objective because of their potential to enable the global analysis of low-molecular-weight metabolites, thus aiding in elucidating systemic perturbations. For instance, in 2010, Yap et al. (2010) reported a perturbation in the tryptophan-nicotinic acid metabolic pathway using an nuclear magnetic resonance-based platform in urine from autistic children. Metabolic alterations related to amino acids, carbohydrates and oxidative stress pathways were then described after urinary analysis using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) (Bitar et al. 2018; Mavel et al. 2013; Ming et al. 2012) and nuclear magnetic resonance (Noto et al. 2014). Overall, the plasma and urine metabolomes associate ASD with perturbed metabolic pathways related to tryptophan, nicotinic acid, purines, vitamin B6, and the enhancement of oxidative stress, as well as gut microbiota alterations. (Gevi et al. 2016; Lussu et al. 2017; Mavel et al. 2013; Mussap et al. 2016; Nadal-Desbarats et al. 2014).

Novel changes in several plasma metabolites in ASD were recently reported (West et al. 2014). Interestingly, such findings, including alterations in the aspartate, citrate, creatinine, DHEA-S, isoleucine, glutamate and glutarate metabolic pathways, had not been previously reported

in the metabolomic profiling of urine (West et al. 2014). Hence, metabolomic analysis in plasma appears to be a suitable tool for further investigation of the disease mechanisms and has the potential to identify metabolic profiles within ASD. Thus, the aim of the present study was to evaluate the metabolomic profile of children with ASD subclassified by mental regression phenotype (AR) and non-mental regression (ANR) in plasma samples with an analytical platform methodology based on LC-MS.

## 2 Subjects and methods

The present study was a cross-sectional case-control study and was approved by the Clinical Research and Bioethics Committee at Reina Sofia University Hospital respecting the fundamental principles established in the Declaration of Helsinki. The selected subjects were incorporated into the study after all inclusion criteria were fulfilled and informed written consent from the children's legal guardians was obtained.

### 2.1 Participants

Fifty-seven ASD children were initially selected for this study (the recruitment started during 2015 in the Department of Psychology, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain). Of those, three children were excluded for not meeting the diagnostic criteria for ASD during the subsequent follow-up interviews at 18 months. Such interview is a follow-up to verify if the individuals continue meeting the DSM-5 Criteria.

All ASD children selected were between 2 and 6 years old with an agreed clinical diagnosis using the criteria of the International Classification Disease 10th Edition for ASD (World Health Organization 1992) and DSM-5 (American Psychiatric Publishing 2013). The diagnosis was confirmed by scores above the cut-off points of two tests, the Autism Diagnostic Observation Schedule test, with revised algorithms, and the Pervasive Developmental Disorders (Behavior Inventory) (PDDBI), the latter as a means of obtaining a measure of the severity of ASD. The ASD group was also classified according to whether the children presented developmental delay (a score lower than 70 in the cognitive quotient of the Battelle developmental test) or not. Within the ASD group, there were 20 children classified as AR and 32 classified as ANR: two children could not be clearly classified into either of these subgroups. The subdivision (ANR and AR) was based on the presence or absence of developmental regression during the first 2 years of life, which was assessed by a five-item questionnaire following the guide used by the ADI-R clinical interview for the evaluation of this process (Kim

and Lord 2012). ASD children who obtained a score equal to or greater than three were included in the mental regression group and those with a score of less than three were included in the non-mental regression group.

ASD children presenting with other known neurological, metabolic or genetic diagnoses were excluded, as were children with medical treatment for autism-related behavioral comorbidities that may interfere with the results, such as sedatives, muscle relaxants or similar.

For the present study, we selected a subsample of 30 ASD subjects (15 ANR and 15 AR) choosing those with higher scores towards one group or another in the tests thus eliminating those with more doubtful data.

Additionally, a control group of 30 normally developing children was selected and matched to the ASD group by sex and age. Children in the control group were chosen from those who came to the hospital for pre-anesthesia for minor surgery (mainly hernias). The clinical and analytical absence of illness was confirmed in this group of healthy children after normal results. Table 1 shows the general characteristics of the selected ASD subgroups and healthy children (HC) participants.

## 2.2 Blood sampling

Blood samples (6 ml) were drawn following a 12-h fast. In all the children with ASD, the blood test was carried out after confirming the diagnosis, at the recruitment. In HC, all the analysis were realized before the anesthesia and surgery intervention. Blood and general biochemical analyses were performed to confirm the absence of other diseases, and other plasma aliquots were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2.3 Metabolomics analysis

The major outcome of the study was to investigate differential metabolomic signatures among groups, therefore, we

considered a broad analytical platform for such aim. Metabolon Inc. (Durham, NC, USA) platform have proven reliable and fit our needs due to its broad coverage. All metabolomics analyses were developed by Metabolon, Inc. (Durham, NC, USA) following methods previously described (Evans et al. 2009, 2014). Details of the analytical methods, data extraction, preprocessing and compound identification are listed in eMethods 1 in Additional File 1.

## 2.4 Statistical analysis

### 2.4.1 Univariate analysis

We used ANOVA tests to identify biochemical compounds that differed significantly between experimental groups. We performed a log transformation (to reduce the heteroscedasticity) and due to the difficulty of this method to handle zero or missing values we imputed missing values, if any, using a value corresponding to half of the minimum positive of each variable. Furthermore, to correct for multiple testing and false positives we used a false discovery rate cut-off of  $q < 0.1$  (more in eMethods 1 in Additional File 1).

### 2.4.2 Multivariate analysis

**2.4.2.1 Data processing** The metabolomics dataset was preprocessed using MetaboAnalyst v4.0 (Xia et al. 2015) (Quebec, Canada). All missing values were replaced using a value corresponding to half of the minimum positive of each variable. Next, the variables were log-transformed and unit variance-scaled. Data were introduced into SIMCA-P (SIMCA-P 15.0, Umetrics, Umeå, Sweden) for multivariate analysis using unsupervised and supervised models.

**2.4.2.2 PCA and OPLS-DA** Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least-squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were carried out to visualize the met-

**Table 1** Demographic, anthropometric data and psychological tests results in children with ASD compared with healthy children

	HC (mean $\pm$ SD)	ANR (mean $\pm$ SD)	AR (mean $\pm$ SD)	p
Sex (male)	4/30	2/15	3/15	NS
Age (months)	48.67 $\pm$ 15.03	44.8 $\pm$ 9.37	45.0 $\pm$ 12.65	NS
Weight (kg)	16.74 $\pm$ 3.6	16.23 $\pm$ 3.4	16.91 $\pm$ 3.6	NS
Height (cm)	101.74 $\pm$ 8.25	103.9 $\pm$ 8.7	104.1 $\pm$ 12.39	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	16.0 $\pm$ 1.6	14.9 $\pm$ 1.5	16.4 $\pm$ 1.7	0.033
Battelle test	—	60.96 $\pm$ 13.29	47.05 $\pm$ 10.33	0.002
CARS test	—	30.6 $\pm$ 6.11	35.9 $\pm$ 8.12	0.009
PDDBI test	—	46.13 $\pm$ 10.47	53.93 $\pm$ 10.39	0.023

p values were obtained from an ANOVA test or Student's *t* test.  $p < 0.05$  was considered statistically significant

ANR autistic without regression, AR autistic with regression, BMI body mass index, CARS Childhood Autism Rating Scale Test, HC healthy children, PDDBI Pervasive Developmental Disorders (Behavior Inventory)

abolic alterations in HC and ASD children and between the AR and ANR groups. PCA modeling was used for an initial exploration of the data with the main purpose of detecting potential outliers and patterns. OPLS-DA models were built to identify patterns and the features that discriminate between the different groups, e.g., ASD vs HC and ANR vs AR. In these discriminant analyses, the default seven-round cross-validation in the SIMCA-P software package was applied. Furthermore, the cross-validation ANOVA (CV-ANOVA) was calculated to assess the reliability of the models (further details in eMethods1). Also 100-fold permutation tests were calculated and its plots and together with the observed vs. predicted plots are included in the supplemental material (eFigure 3). We also obtained the so-called variable importance in the projection (VIP) values that were relevant for group discrimination. We selected features with a  $VIP > 1.5$  to integrate the pathway analysis. Furthermore, the advantage of using OPLS-DA is the capability of this model to decompose the data into “predictive” information related to the response of Y (in our study, HC vs ASD, ANR or AR) and “orthogonal” structured information not related to the response (and that could be related to other factors such as technical or biological variation).

To improve the interpretation, shared-and-unique (SUS)-plots were built using the  $p(\text{corr})$  of two different models. Thus, it is possible to extract metabolites related to a specific model and to identify shared features between both models either in a similar trend or in the inverse direction (more details are provided in eFigure 1 in Additional File 1).

### 3 Results

#### 3.1 General characteristics

Table 1 also shows the results of the Battelle, CARS and PDDBI psychological tests for both AR and ANR children, which were significantly different among groups.

#### 3.2 Metabolite identification using an untargeted approach in a UPLC–MS/MS platform

Plasma metabolic profiling was established to explore metabolic patterns associated with ASD and the mental regression status. Seven-hundred fifty metabolites were detected: 295 in C18-negative mode, 75 in negative HILIC mode, 189 in early positive mode and 191 in late positive mode. A summary of the compounds that achieved statistical significance ( $p \leq 0.05$ ) between the ASD and HC groups is shown in eTable 1 in Additional File 2.

#### 3.2.1 Univariate analysis: single differences between classes

**3.2.1.1 HC versus ASD** ANOVA of the HC and ASD groups showed several metabolites whose concentrations differed significantly (eTable 1 in Additional File 2;  $p < 0.001$  and  $FDR < 0.1$ ). Such metabolites corresponded mainly to the malate-aspartate shuttle, the urea cycle, ammonia recycling, the glucose-alanine cycle, beta-alanine metabolism, and the aspartate and tryptophan metabolic pathways (according to KEGG pathway analysis). A heatmap (including the top 25 significant metabolites) in which it was possible to highlight the differences between the two groups can be seen in Fig. 1.

**3.2.1.2 ANR versus AR** When comparing the ANR and AR subgroups, seven compounds (decanoylcarnitine C10, arachidate, laurate, octanoylcarnitine, quinate, 7-methylurate and myristate) were significantly different (all  $p < 0.001$  and  $FDR < 0.1$ ). These metabolites were related mainly to fatty acid metabolism, except for quinate and 7-methylurate.

#### 3.2.2 Multivariate analysis

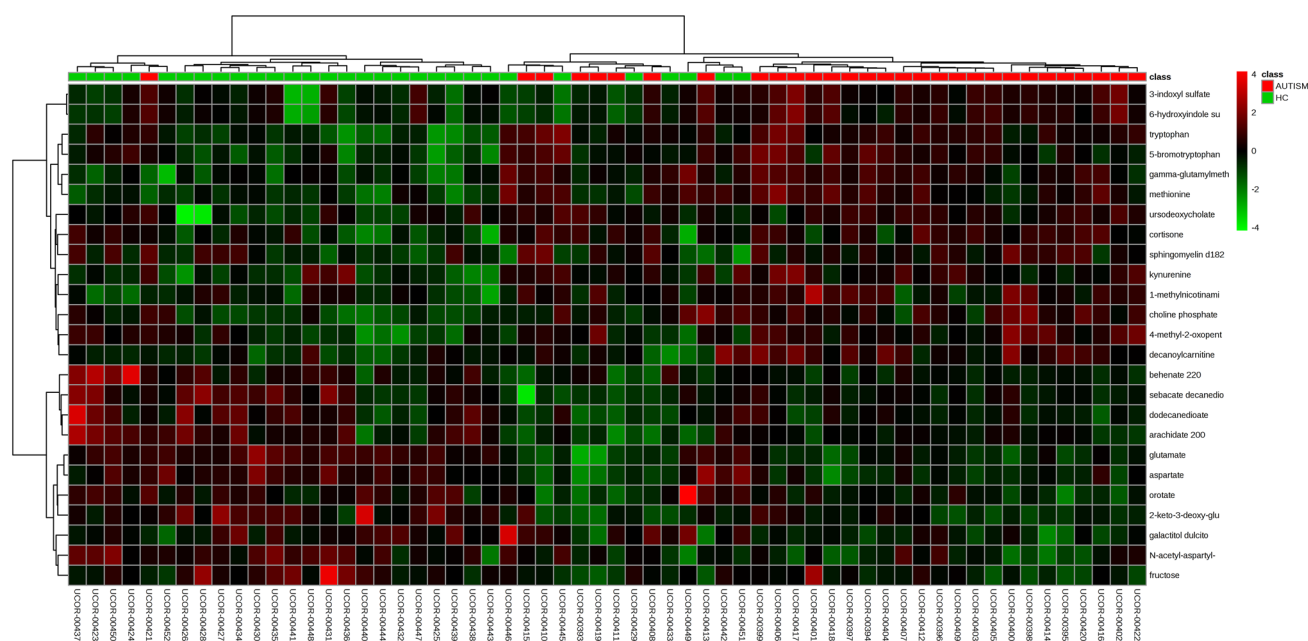
**3.2.2.1 PCA** It was not possible to identify a valid separation between the HC and ASD groups using this approach (Fig. 2a). When labelling the samples as HCs, ANR and AR we did not detect any clustering (Fig. 2b (PCA model:  $R = 0.66$ ;  $Q = 0.0708$ )).

**3.2.2.2 OPLS-DA modeling** Four different models were built. The first compared the HC vs ASD groups (Fig. 2c). The other models built were as follows: HC vs ANR, HC vs AR and ANR vs AR (non-significant). Table 2 summarizes the predictive abilities of each constructed model, and several lists of VIP (total, predictive and orthogonal) features are included in eTables 2–4 in Additional File 2.

The SUS-plot (eFigure 1 in Additional File 1), which combines the HC vs ANR and HC vs AR models (built in binary mode using the HC group as a reference), helps identify two metabolites shared by both models in a decreasing trend in both subgroups (glutamate and aspartate). 4-Methyl-oxopentanoate was found in both models but in an increasing trend. Furthermore, three metabolites were identified in relation to ANR in an increasing trend: 3-methylxanthine, 7-methylurate and 3-methylhistidine. Finally, we identified a decrease in laurate as the only marker specific to the AR group.

#### 3.3 Pathway enrichment analysis constructed using OPLS-DA predictive and orthogonal components

Two lists of VIP features were used for the pathway enrichment analysis using MetaboAnalyst 4.0: one was built from



**Fig. 1** Heatmap built using the top 25 significant metabolites between the HC and ASD groups. The significant metabolites were selected using a *t* test. The color bar corresponds to the fold change from HC vs ASD

the predictive component (related to the class) and the other was built from the orthogonal components (not related to the class but to orthogonal variation). Due to limitations of the database (KEGG pathways) within the MetaboAnalyst platform, not all the metabolites were recognized. Additionally, an over-representation analysis was performed without significant results after FDR cutoff (Figure included as eFigure 3).

### 3.3.1 HC versus ASD

Ninety-one metabolites were selected from the predictive component (eTable 2); however, only 77 were recognized. The integration of these metabolites showed that five canonical pathways were significantly modified in the ASD group compared with HCs, namely, aminoacyl-tRNA biosynthesis, alanine, aspartate and glutamate metabolism, galactose and nicotinate and nicotinamide metabolism and panthothenate and CoA (all with raw *p* values  $\leq 0.01$  and FDR  $< 0.1$ ). The inclusion of compounds into the orthogonal component revealed only a change in aminoacyl-tRNA biosynthesis, which did not correlate with the ASD condition (*p* value  $\leq 0.01$  and FDR  $< 0.1$ ).

### 3.3.2 HC versus ANR

The pathway enrichment analysis included 88 metabolites from the predictive component and 80 from the orthogonal component (eTable 3). Only caffeine metabolism in the

first and nitrogen metabolism in the latter were significantly affected (raw *p* values  $\leq 0.01$  and FDR  $< 0.1$ ).

### 3.3.3 HC versus AR

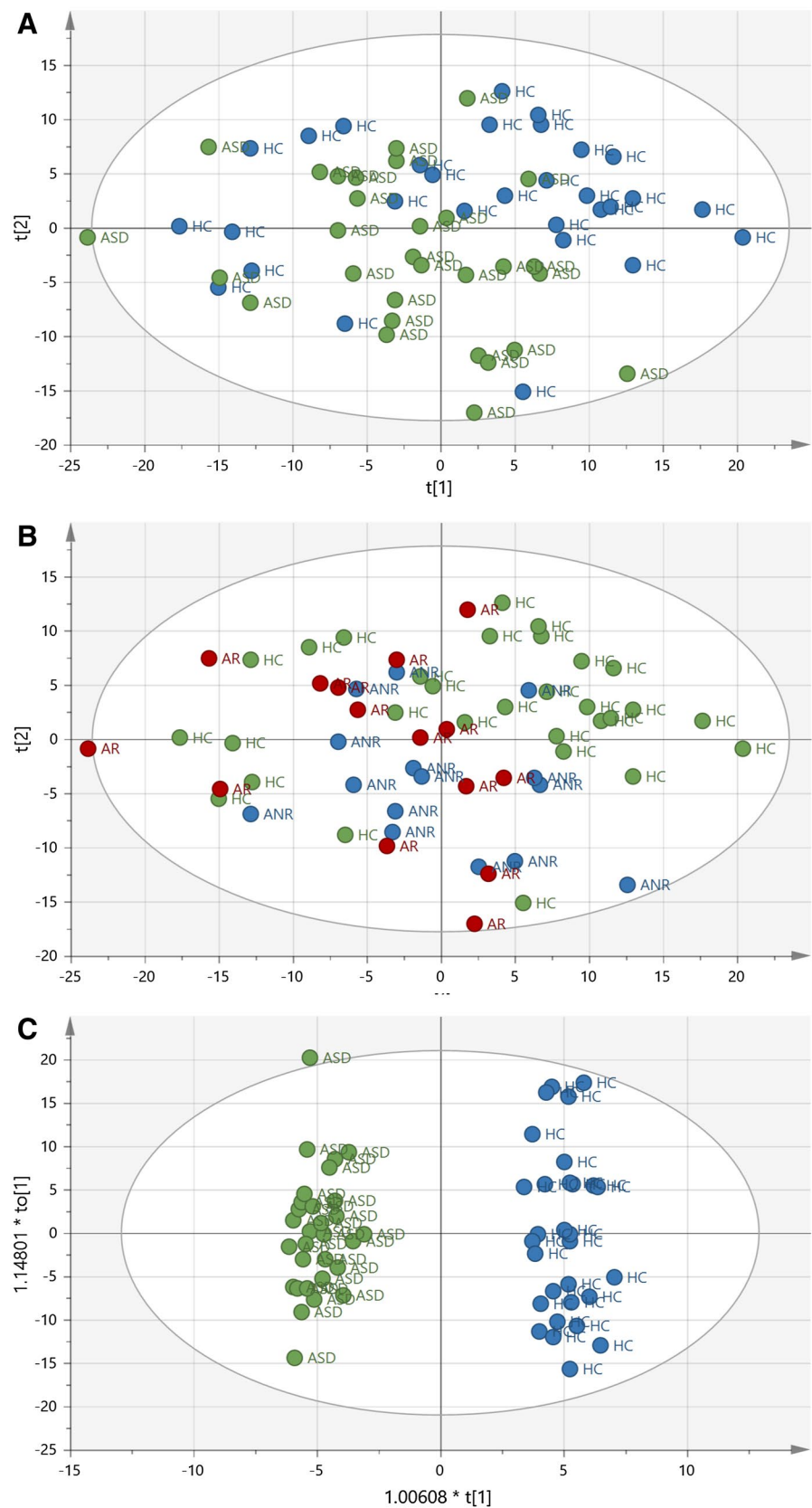
Ninety-four compounds from the predictive component and 58 from the orthogonal components were analyzed (eTable 4); Four canonical pathways reflected a significant change related to the predictive component, namely, aminoacyl-tRNA biosynthesis; alanine, aspartate and glutamate metabolism; panthothenate; and CoA and fatty acid biosynthesis (raw *p* values  $\leq 0.01$  and FDR  $< 0.1$ ). No pathway was associated with the orthogonal component.

## 4 Discussion

In this study, we report, for the first time, the plasmatic metabolomic profiling of ASD children subclassified by mental regression (AR) phenotype and with no regression (ANR). With the use of an LC-MS platform including C18 and HILIC columns, we covered a broad range of metabolites, which was complemented with comprehensive statistical and pathway enrichment analyses. We present several alterations observed in ASD compared with HCs involving mainly amino acid, lipid and nicotinamide metabolism. However, we were able to distinguish only subtle significant differences when isolating the ASD subgroups.



**Fig. 2** **a** PCA scores plot including samples from HC and ASD. *HC* healthy children, *ASD* autistic children. **b** PCA scores plot including samples from HC and autistic children (labelled as ANR and AR). *HC* healthy children, *AR* autistic mental-regression children, *ANR* autistic non-mental regression children. **c** OPLS-DA model score plot showing separation by condition, including ASD children and HCs. *HC* healthy children, *ASD* autistic children



**Table 2** Summary of the predictive abilities of the OPLS-DA models constructed

Comparison	Predictive component	Orthogonal components	R <sup>2</sup> X (cum)	R <sup>2</sup> Y (cum)	Q <sup>2</sup> (cum)	CV-ANOVA
HC vs. ASD	1	2	0.2	0.939	0.625	1.33E <sup>-09</sup>
HC vs. ANR	1	2	0.206	0.950	0.539	2.696E <sup>-05</sup>
HC vs. AR	1	3	0.261	0.977	0.401	0.0130924
ANR vs. AR	NS	NS	NS	NS	NS	NS

ANR ASD without mental regression, AR ASD with mental regression, ASD autism spectrum disorder, NS non-significant

Due to the complexity of ASD, rather than focusing on single biomarkers, which might result in inaccurate results, the strength of our research lies in the integration of the most discriminant metabolites (and the exclusion of the orthogonal metabolites) in their respective pathways, which was provided by the OPLS-DA modelling. Nevertheless, the use of univariate and multivariate analysis should be considered as complementary and confirmatory; i.e. laurate that was significantly different between ANR and AR as shown in the univariate analysis, also appeared to be as a significant discriminator in the SUS-plot (built from the multivariate modeling).

#### 4.1 Endogenous metabolites

Glutamate functions as a major excitatory molecule in the brain, and alterations in its metabolism can lead to imbalances in the excitation/inhibition equilibrium of neural networks, which may lead to autistic-like symptoms. Herein, we report similar decrease in glutamate in both the ANR and AR groups compared with the HC group (in both univariate and multivariate analysis). Although the relative concentrations of aspartate and glutamate were modified in both groups, other metabolites were specific within each group, as shown by both statistical analyses, such as gamma carboxyglutamate, N-Carboxyethyl-gamma-aminobutyric acid and 4-hydroxyglutamate in the ANR group and N-acetyl-aspartyl-glutamate (NAAG) in the AR group. Alterations of these metabolic pathways in ASD have been previously reported in urine but in an inverse manner (Kałużna-Czaplińska et al. 2017; Rolf et al. 1993; Rossignol and Frye 2012; Yap et al. 2010) and may be related with the pathogenesis of the disorder and disease severity (Alabdali et al. 2014). However, they may also be associated with food restrictions, such as diets low in protein or lacking certain types of food or impaired digestion. Also, the restriction might lead to the substitution with other types of foods thus this should be analyzed thoroughly (Kałużna-Czaplińska et al. 2017). Interestingly, using the SUS-plot, we identified metabolites specific to each group that although have been proposed as biomarkers of intake of dietary products, such as meat (Schmedes et al. 2016) or cocoa (Garcia-Aloy et al. 2015) could

be related also to some metabolic alterations and need to be studied in detail in further studies.

Some biochemicals comprising the malate-aspartate shuttle were decreased in the entire ASD cohort (as shown in both analyses), suggesting deregulation in this mitochondrial process. The malate-aspartate shuttle is a crucial system that supports oxidative phosphorylation and ATP production (Napolioni et al. 2011). We should note that changes in the activity of aspartate-glutamate carriers have been detected in gray matter obtained from autistic individuals (Palmieri et al. 2010). Taken together, the imbalance in glutamate metabolism may also originate from changes in malate-aspartate shuttle activity.

Arginine, N-acetylarginine, homoarginine and n-alpha-acetylmethionine discriminated the ASD cohort, and particularly the AR group, from the control group (multivariate analysis, univariate analysis only shows arginine as significant). In this regard, urinary (Diémé et al. 2015) and plasmatic (Delwing et al. 2008) arginine have been reported to be increased in ASD children. An excessive amount of arginine and its compounds might increase oxidative stress by increasing nitric oxide (NO). As reviewed by Rossignol et al. it seems that ASD patients might be both, more vulnerable to NO and present higher concentrations of NO at baseline, factors that could act synergistically to cause significant mitochondrial impairment (Rossignol and Frye 2012). Our findings suggest that AR subjects have a more dysregulated NO pathway, and such alterations may be related with the regression.

The branched-chain amino acids (BCAAs), valine, isoleucine, and leucine, are important constituents of proteins but are also readily degraded into carbon skeletons that may enter anabolic pathways (i.e., gluconeogenesis or fatty acid synthesis) or pathways associated with energy generation (i.e., the TCA cycle). In the present study, we found a possible alteration in the BCAA metabolism in ASD, which was supported by an accumulation of several alpha-keto derivatives, such as 3-methyl-2-oxobutyrate, 3-methyl-2-oxovalerate, and 4-methyl-2-oxopentanoate. These accumulations indicate that these compounds exhibit reduced incorporation into the TCA cycle, thus contributing to alterations in anabolic processes and/or energy generation. These changes

point towards a dysregulation in glutamate homeostasis, as the BCAA aminotransferase utilizes alpha-ketoglutarate to transfer the amino group and forms glutamate, both of which were decreased in the ASD cohort (univariate and multivariate analyses). Moreover, in connection with these alterations, we detected an increase in carnitine-conjugated intermediates (i.e., isovalerylcarnitine and isobutyrylcarnitine) in the ASD cohort, and acylcarnitines decanoylcarnitine and octanoylcarnitine were significantly higher in the ANR group than the AR group as shown in the univariate and multivariate analyses. It is known that the inhibition of the TCA cycle may result in an elevation of TCA cycle intermediates but also impairs fatty acid  $\beta$ -oxidation. Therefore, these abnormalities may be associated with mitochondrial dysfunction in children with ASD (Frye et al. 2013; Ros-signal and Frye 2012).

In addition, the association between alterations in urinary tryptophan metabolism in autistic children (Kałuzna-Czaplińska et al. 2017) entails numerous irregularities, including the serotonin pathways. In this regard, we found that tryptophan was significantly higher in both subgroups (ANR and AR, both statistical analyses) than in HCs. Furthermore, other tryptophan-associated metabolites, such as kynurenine, 5-bromotryptophan, 3-indoxyl sulfate, indolelactate and 6-hydroxyindole sulfate, were elevated in the ANR group. Kynurenine is produced by indoleamine 2,3-dioxygenase in response to inflammatory stimuli. Thus, an increase in the kynurenine level may reflect increased inflammation in the ASD group. Changes in  $\text{NAD}^+$  metabolism were noted, with a significant decline in the nicotinamide levels and increases in 1-methyl-nicotinamide and N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide (with a VIP = 1.46) in the ASD cohort. Remarkably, similar changes, but in urine, have been reported (Adams et al. 2011; Yap et al. 2010). Nicotinamide is a key intermediate in the synthesis of  $\text{NAD}^+$ , a coenzyme that plays a vital role in redox reactions by accepting electrons and forming NADH as part of  $\beta$ -oxidation, glycolysis, and the TCA cycle. In ASD patients, a decrease in the conversion of tryptophan to melatonin could lead to an increase in nicotinic synthesis, thus increasing the demand for methylation and increasing the susceptibility to oxidative stress (Mussap et al. 2016). In fact, n-methyl nicotinamide and N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide have been implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease (Fukushima et al. 1995; Willets et al. 1993).

## 4.2 Lipid metabolism

Evidence has shown that abnormalities in lipid metabolism may play a role in the pathogenesis of ASD and can be connected with metabolic and dietary alterations in the regressive form of autism (El-Ansary et al. 2011; Goldani et al. 2014). The lysolipids

1-palmitoyl-glycerol-phosphatidyl-ethanolamine (GPE) and 1-stearoyl-GPE were decreased in plasma obtained from autistic individuals (univariate and multivariate analysis, eTables 1, 2). These are degradation products derived from phospholipids and are formed when phospholipases remove fatty acid moieties from the *Sn*-1 and *Sn*-2 positions of phospholipids (Khaselev and Murphy 2000). Changes in triacylglycerol metabolism were also noted based on mental regression status, with an accumulation of several species of mono- and diacylglycerols in the AR group compared to the ANR group (univariate analysis, eTable 1). Mono- and diacylglycerols are intermediates in triacylglycerol metabolism; they are formed when lipases remove fatty acids from the glycerol backbone of triacylglycerols. Moreover, the univariate analysis (eTable 1) revealed that there was a marked decrease in both long- and medium-chain fatty acids in samples from the AR group. These alterations may indicate differences in triacylglycerol and phospholipid metabolism, fatty acid utilization, and beta-oxidation. We should note that the changes in free fatty acids were more pronounced in the AR subgroup and, in some cases, showed significant changes between the AR and ANR groups (i.e., myristate and palmitate) in the univariate analysis, and the change in laurate appears to be specific to the AR group, as reflected in the univariate and the SUS-plot (the OPLS-DA model comparing AR and ANR was not analyzed due to the lack of significance and thus, invalid). These results agree with the report by El-Ansary (El-Ansary et al. 2011) in which they concluded that impaired fatty acid profiles could be used as highly reliable diagnostic biomarkers in a Saudi autistic cohort and may reflect mitochondrial dysfunction as a putative causative mechanism (Pastural et al. 2009).

Several sphingomyelins discriminated the ASD cohort (eTable 2) from the HCs in the predictive component. However, due to limitations in the MetaboAnalyst module, it was not possible to integrate them into their respective pathways. Nevertheless, an alteration in sphingolipid metabolism, in particular sphingomyelins, has been associated with autism and is due to an abnormal developmental trajectory of white matter (Barnea-Goraly et al. 2004; Mak-Fan et al. 2013; Wang et al. 2016). Nonetheless, we did not observe differences among the subgroups.

Overall, the pathway enrichment analysis showed several routes modified in the ASD cohort compared with HCs. Nonetheless, when analyzing the subgroups, these routes were not maintained; the ANR group showed fewer changes. We speculate that differences in the AR group were strong enough to make significant differences in the ASD cohort and therefore these differences may be associated with the regression in the disease. However, we could not discard that some changes may be related to lifestyle (i.e., diet, physical activity, etc.) although we used a multivariate model which



helps to isolate the effect of features that are not related to the class studied (in this case, ASD or its subgroups).

The global approach that we developed in the present study seems to be very effective and provides broad coverage; however, it is important to address several limitations. Although it was possible to detect significant differences between the groups and using cross-validation methods in the multivariate analysis, the sample size was small, and a larger number of subjects should be included in further studies to detect more subtle changes, particularly when comparing the AR and ANR subgroups. Differences between the univariate and multivariate analysis show slightly differences that might be due to the restrictive cutoffs utilized on each type of analysis, however, the use of both approaches help us to confirm some changes with confidence when they appear in both analyses.

Moreover, it is necessary to perform targeted analyses to make a proper quantification of the metabolites and their impact through the different metabolic pathways and to validate these findings reported in an external cohort.

Our main interest is to continue this investigation including data from the microbiome and additional food intake and lifestyle questionnaires to identify the changes relates to the latter or those linked to the disease or a specific phenotype. In the future, if a genetic or molecular profile in patients could be identified, patients could be stratified according to it and subsequently compared regarding cognitive, neuroimaging and biochemical measures to treat individuals with ASD more efficiently and with a more personalized approach (Howes et al. 2018).

## 5 Conclusion

In summary, the use of an LC-MS platform approach, including C18 and HILIC columns, for metabolomics in ASD children using plasma appears to have a broad coverage of the metabolome and adds further support to previous findings in urine, such as changes in tryptophan and nicotinic acid metabolic pathway. Furthermore, the present study documents several changes related to amino acid, NAD<sup>+</sup> and lipid metabolism in plasma. In some cases, such as in the arginine and the glutamate pathways and free fatty acids, alterations may be associated with mental regression in ASD. Further targeted analyses, including a systems biology approach with the study of genome, transcriptome and the study of the microbiome, including a larger cohort are needed to validate the results presented herein. Research regarding potential mitochondrial dysfunction in a subset of ASD subjects is guarantee.

**Acknowledgements** We gratefully acknowledge the patients, controls and family members who participated in this study.

**Author contributions** ODRH conducted the metabolomics data analyses, analyzed and interpreted the biochemical data and wrote the manuscript. AGF, MJTA, collected the plasma samples, interpreted the data. MGC and AG designed the study. JLPN, KFR, PMB were responsible of the clinical assessments and interpreted the data. All authors read and approved the manuscript.

**Funding** ODRH has received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7-PEOPLE-2013-COFUND) under grant agreement n° 609020 - Scientia Fellows.

**Data availability** The metabolomics datasets used and/or analyzed during the current study are included as Supplemental Material and any additional data is available from the corresponding author on reasonable request.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no competing interests.

**Ethical approval** The present study was a cross-sectional case-control study case-control study and was approved by the Clinical Research and Bioethics Committee at Reina Sofia University Hospital respecting the fundamental principles established in the Declaration of Helsinki of 1964.

**Informed consent** Informed consent from the children's legal guardians was obtained.

## References

- Adams, J. B., Audhya, T., McDonough-Means, S., Rubin, R. A., Quig, D., Geis, E., et al. (2011). Nutritional and metabolic status of children with autism vs. neurotypical children, and the association with autism severity. *Nutrition & Metabolism*, 8(1), 34. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-8-34>.
- Alabdali, A., Al-Ayadhi, L., & El-Ansary, A. (2014). Association of social and cognitive impairment and biomarkers in autism spectrum disorders. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-4>.
- Altieri, L., Neri, C., Sacco, R., Curatolo, P., Benvenuto, A., Muratori, F., et al. (2011). Urinary p-cresol is elevated in small children with severe autism spectrum disorder. *Biomarkers*. <https://doi.org/10.3109/1354750x.2010.548010>.
- American Psychiatric Publishing, I. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5™* (5th ed.). Arlington: American Psychiatric Publishing Inc.
- Barnea-Goraly, N., Kwon, H., Menon, V., Eliez, S., Lotspeich, L., & Reiss, A. L. (2004). White matter structure in autism: Preliminary evidence from diffusion tensor imaging. *Biological Psychiatry*, 55(3), 323–326. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2003.10.022>.
- Bitar, T., Mavel, S., Emond, P., Nadal-Desbarats, L., Lefèvre, A., Mattar, H., et al. (2018). Identification of metabolic pathway disturbances using multimodal metabolomics in autistic disorders in a Middle Eastern population. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 152, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.01.007>.
- Delwing, D., Delwing, D., Bavaresco, C. S., & Wyse, A. T. S. (2008). Protective effect of nitric oxide synthase inhibition or antioxidants on brain oxidative damage caused by intracerebroventricular

- arginine administration. *Brain Research*, 1193, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.11.052>.
- Diémé, B., Mavel, S., Blasco, H., Tripi, G., Bonnet-Brilhault, F., Malvy, J., et al. (2015). Metabolomics study of urine in autism spectrum disorders using a multiplatform analytical methodology. *Journal of Proteome Research*, 14(12), 5273–5282. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00699>.
- El-Ansary, A. K., Ben Bacha, A. G., & Al- Ayahdi, L. Y. (2011). Plasma fatty acids as diagnostic markers in autistic patients from Saudi Arabia. *Lipids in Health and Disease*, 10(1), 62. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-62>.
- Evans, A. M., Bridgewater, B. R., Liu, Q., Mitchell, M. W., Robinson, R. J., Dai, H., et al. (2014). High resolution mass spectrometry improves data quantity and quality as compared to unit mass resolution mass spectrometry in high-throughput profiling metabolomics. *Journal of Postgenomics Drug & Biomarker Development*. <https://doi.org/10.4172/2153-0769.1000132>.
- Evans, A. M., DeHaven, C. D., Barrett, T., Mitchell, M., & Milgram, E. (2009). Integrated, nontargeted ultrahigh performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry platform for the identification and relative quantification of the small-molecule complement of biological systems. *Analytical Chemistry*, 81(16), 6656–6667. <https://doi.org/10.1021/ac901536h>.
- Frye, R. E., Melnyk, S., & MacFabe, D. F. (2013). Unique acylcarnitine profiles are potential biomarkers for acquired mitochondrial disease in autism spectrum disorder. *Translational Psychiatry*, 3(1), e220. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.143>.
- Fukushima, T., Tawara, T., Isobe, A., Hojo, N., Shiwaku, K., & Yamane, Y. (1995). Radical formation site of cerebral complex I and Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Research*, 42, 385–390.
- Gabriele, S., Sacco, R., Cerullo, S., Neri, C., Urbani, A., Tripi, G., et al. (2014). Urinary p-cresol is elevated in young French children with autism spectrum disorder: A replication study. *Biomarkers*. <https://doi.org/10.3109/1354750x.2014.936911>.
- Garcia-Aloy, M., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Jáuregui, O., Corella, D., Ruiz-Canela, M., et al. (2015). A metabolomics-driven approach to predict cocoa product consumption by designing a multimetabolite biomarker model in free-living subjects from the PREDIMED study. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(2), 212–220. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400434>.
- Gevi, F., Zolla, L., Gabriele, S., & Persico, A. M. (2016). Urinary metabolomics of young Italian autistic children supports abnormal tryptophan and purine metabolism. *Molecular Autism*, 7(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s13229-016-0109-5>.
- Goldani, A. A. S., Downs, S. R., Widjaja, F., Lawton, B., & Hendren, R. L. (2014). Biomarkers in autism. *Frontiers in Psychiatry*, 5, 100. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2014.00100>.
- Howes, O. D., Rogdaki, M., Findon, J. L., Wichers, R. H., Charman, T., King, B. H., et al. (2018). Autism spectrum disorder: Consensus guidelines on assessment, treatment and research from the British Association for Psychopharmacology. *Journal of Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1177/0269881117741766>.
- Kałużna-Czaplińska, J., Jóźwik-Pruska, J., Chirumbolo, S., & Björklund, G. (2017). Tryptophan status in autism spectrum disorder and the influence of supplementation on its level. *Metabolic Brain Disease*, 32(5), 1585–1593. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-0045-x>.
- Khaselev, N., & Murphy, R. C. (2000). Structural characterization of oxidized phospholipid products derived from arachidonate-containing plasmenyl glycerophosphocholine. *Journal of Lipid Research*, 41(4), 564–572.
- Kim, S. H., & Lord, C. (2012). New autism diagnostic interview-revised algorithms for toddlers and young preschoolers from 12 to 47 months of age. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 42(1), 82–93. <https://doi.org/10.1007/s10803-011-1213-1>.
- Lussu, M., Noto, A., Masili, A., Rinaldi, A. C., Dessì, A., De Angelis, M., et al. (2017). The urinary 1H-NMR metabolomics profile of an Italian autistic children population and their unaffected siblings. *Autism Research*, 10(6), 1058–1066. <https://doi.org/10.1002/aur.1748>.
- Mak-Fan, K. M., Morris, D., Vidal, J., Anagnostou, E., Roberts, W., & Taylor, M. J. (2013). White matter and development in children with an autism spectrum disorder. *Autism*, 17(5), 541–557. <https://doi.org/10.1177/1362361312442596>.
- Mavel, S., Nadal-Desbarats, L., Blasco, H., Bonnet-Brilhault, F., Barthélémy, C., Montigny, F., et al. (2013). 1H-13C NMR-based urine metabolic profiling in autism spectrum disorders. *Talanta*, 114, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.064>.
- Ming, X., Stein, T. P., Barnes, V., Rhodes, N., & Guo, L. (2012). Metabolic perturbation in autism spectrum disorders: A metabolomics study. *Journal of Proteome Research*, 11(12), 5856–5862. <https://doi.org/10.1021/pr300910n>.
- Mussap, M., Noto, A., & Fanos, V. (2016). Metabolomics of autism spectrum disorders: Early insights regarding mammalian-microbial cometabolites. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 16(8), 869–881. <https://doi.org/10.1080/14737159.2016.1202765>.
- Nadal-Desbarats, L., Aïdoud, N., Emond, P., Blasco, H., Filipiak, I., Sarda, P., et al. (2014). Combined 1H-NMR and 1H-13C HSQC-NMR to improve urinary screening in autism spectrum disorders. *Analyst*, 139(13), 3460–3468. <https://doi.org/10.1039/c4an00552j>.
- Napolioni, V., Persico, A. M., Porcelli, V., & Palmieri, L. (2011). The mitochondrial aspartate/glutamate carrier AGC1 and calcium homeostasis: Physiological links and abnormalities in autism. *Molecular Neurobiology*, 44(1), 83–92. <https://doi.org/10.1007/s12035-011-8192-2>.
- Noto, A., Fanos, V., Barberini, L., Grapov, D., Fattuoni, C., Zaffanello, M., et al. (2014). The urinary metabolomics profile of an Italian autistic children population and their unaffected siblings. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 27(sup2), 46–52. <https://doi.org/10.3109/14767058.2014.954784>.
- Palmieri, L., Papaleo, V., Porcelli, V., Scarcia, P., Gaita, L., Sacco, R., et al. (2010). Altered calcium homeostasis in autism-spectrum disorders: Evidence from biochemical and genetic studies of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier AGC1. *Molecular Psychiatry*, 15(1), 38–52. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.63>.
- Pastural, É., Ritchie, S., Lu, Y., Jin, W., Kavianpour, A., Khine Su Myat, K., et al. (2009). Novel plasma phospholipid biomarkers of autism: Mitochondrial dysfunction as a putative causative mechanism. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 81(4), 253–264. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2009.06.003>.
- Rolf, L. H., Haarmann, F. Y., Grottemeyer, K. H., & Kehrer, H. (1993). Serotonin and amino acid content in platelets of autistic children. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 87(5), 312–316.
- Rossignol, D. A., & Frye, R. E. (2012). Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Molecular Psychiatry*, 17(3), 290–314. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.136>.
- Schmedes, M., Aadland, E. K., Sundekilde, U. K., Jacques, H., Lavigne, C., Graff, I. E., et al. (2016). Lean-seafood intake decreases urinary markers of mitochondrial lipid and energy metabolism in healthy subjects: Metabolomics results from a randomized crossover intervention study. *Molecular Nutrition*

- & Food Research, 60(7), 1661–1672. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500785>.
- Wang, H., Liang, S., Wang, M., Gao, J., Sun, C., Wang, J., et al. (2016). Potential serum biomarkers from a metabolomics study of autism. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 41(1), 27–37. <https://doi.org/10.1503/jpn.140009>.
- West, P. R., Amaral, D. G., Bais, P., Smith, A. M., Egnash, L. A., Ross, M. E., et al. (2014). Metabolomics as a tool for discovery of biomarkers of autism spectrum disorder in the blood plasma of children. *PLoS ONE*, 9(11), e112445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112445>.
- Willets, J. M., Lunec, J., Williams, A. C., & Griffiths, H. R. (1993). Neurotoxicity of nicotinamide derivatives: Their role in the aetiology of Parkinson's disease. *Biochemical Society Transactions*, 21(Pt 3), 299S.
- World Health Organization. (1992). The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders. *International Classification, 10*, 1–267. [https://doi.org/10.1002/1520-6505\(2000\)9:5%3c201:AID-EVAN2%3e3.3.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1520-6505(2000)9:5%3c201:AID-EVAN2%3e3.3.CO;2-P).
- Xia, J., Sinelnikov, I. V., Han, B., & Wishart, D. S. (2015). MetaboAnalyst 3.0—Making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv380>.
- Yap, I. K. S., Angley, M., Veselkov, K. A., Holmes, E., Lindon, J. C., & Nicholson, J. K. (2010). Urinary metabolic phenotyping differentiates children with autism from their unaffected siblings and age-matched controls. *Journal of Proteome Research*, 9(6), 2996–3004. <https://doi.org/10.1021/pr901188e>.

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## FICHA TÉCNICA DE PRODUCTO

**Producto:** **EUPOLY-3® DHA Infant**  
**Composición:** *Aceite de pescado refinado y estabilizado mediante la adición de lecitina de soja, tocoferoles de origen natural y palmitato de ascorbilo.*  
**Código de producto:** **EUP007**  
**Apariencia:** *Líquido ligeramente amarillento con olor y sabor característico de aceite de pescado.*

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	OBSERVACIONES
Los siguientes parámetros se analizan sobre todos los lotes de producto final		
Índice de acidez	máximo <b>0,8</b>	mgKOH/g
Índice de peróxidos	máximo <b>2,0</b>	mEq O <sub>2</sub> /kg
Índice de anisidina	máximo <b>15</b>	
TOTOX	máximo <b>19</b>	(2xI.Peróxidos + I. Anisidina)
DHA – (C22:6n3)	mínimo <b>25</b>	% GC área (25 picos)
EPA + DHA	mínimo <b>30,0</b>	% GC área (25 picos)
Total Omega-3	mínimo <b>33</b>	% GC área (25 picos)
Estabilidad oxidativa	mínimo <b>8</b>	Horas Rancimat (100 °C)
Los siguientes parámetros se analizan sobre la materia prima antes del refinado (punto crítico según sistema HACCP) y de forma periódica (3-5 muestras por año) sobre el producto final.		
Pérdida por desecación (102 °C)	máximo <b>0,3</b>	g/100 g
Plomo	máximo <b>0,1 mg/kg</b>	ICP-MS
Cadmio	máximo <b>0,1 mg/kg</b>	ICP-MS
Mercurio	máximo <b>0,1 mg/kg</b>	ICP-MS
Arsénico	máximo <b>0,1 mg/kg</b>	ICP-MS
PCDD/PCDFs	máximo <b>1,75 pg WHO-TEQ/g</b>	HRGC-HRMS
PCDD/PCDFs + PCBs-similares a dioxinas	máximo <b>6,0 pg WHO-TEQ/g</b>	HRGC-HRMS
Suma CIEM-6	máximo <b>200 ng/g grasa</b>	HRGC-HRMS
PAH4	máximo <b>0,01 mg/kg</b>	GC-MS (QQQ)
Pesticidas (OP + OC + piretroides)	Conforme a legislación en vigor	LC-MS (QQQ) y GC-MS (QQQ)
Benzo (a) pireno	máximo <b>2,0 ng/g</b>	GC-MS (QQQ)

**Almacenamiento:** Conservar, en el envase original sin abrir, en lugar seco protegido de la luz directa y de fuentes de calor.

**Consumo preferente:** A temperatura ambiente (preferiblemente por debajo de 25 °C), 8 meses desde la fecha de fabricación.  
Antes de su uso, atemperar el producto entre 15 y 25 °C al menos durante 12 h, y agitar vigorosamente para una correcta homogeneización del aceite.  
Una vez abierto el envase, proteger de la luz y el aire y usar en los 3-4 días siguientes.

Aprobado-QA  
07/11/2013

Versión del documento: FTP-EUP007-10 (Noviembre /2013)  
Este es un documento informático y por lo tanto no requiere firma.





## 7 OTRA PRODUCCIÓN CIENTÍFICA Y RECONOCIMIENTOS

### 7.1 Premios y reconocimientos

**1-Beca de investigación Invest-AEP de la Asociación Española de Pediatría**, al proyecto “Detección de alteraciones epigenéticas en pacientes infantiles con Trastorno del Espectro Autista” (2018).

**2-Beca Ballabriga concedida por la Sociedad Española de Investigación en Nutrición Pediátrica (SEINAP)** por el trabajo “Eficacia y seguridad del ácido docosahexaenoico en el tratamiento coadyuvante de niños con Trastorno del espectro Autista” (2019).

### 7.2 Comunicaciones en Reuniones Científicas y Congresos nacionales

1-Antonio Gómez Fernández AR, Flores Rojas K, Dominguez Osorio I, De la Torre Aguilar MJ, Pérez Navero JL, Gil Campos M. **EVALUACIÓN NUTRICIONAL EN NIÑOS PREESCOLARES CON TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA.** XVI Congreso de la Sociedad Española de Investigación en Nutrición Pediátrica. 30 de septiembre y 1 de octubre de 2016.

2-Cristina Pérez-García, Antonio R. Gómez-Fernández, Maria José de la Torre Aguilar, Katherine Flores-Rojas, Juan Luis Pérez-Navero, Mercedes Gil-Campos.**PLASMA PROFILE OF CYTOKINES AND ADHESION MOLECULES IN CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDER.** 8 th Imibic Young Investigators Meeting. Córdoba. 30 y 31 de mayo de 2017.

3-Cristina Pérez-García, Antonio R. Gómez-Fernández, Fernando Gil Hernández, Katherine Flores-Rojas, Concepción Martín-Domingo, Maria José de la Torre Aguilar, Juan Luis Pérez-Navero, Mercedes Gil-Campos. **AUTISM SPECTRUM DISORDERS IS NOT ASSOCIATED WITH NEUROTOXICITY BY MERCURY.**8 th Imibic Young Investigators Meeting. Córdoba. 30 y 31 de mayo de 2017.

4-Antonio R. Gómez-Fernández, Katherine Flores-Rojas, María José de la Torre Aguilar, Pilar Martín Borreguero, Mercedes Gil Campos, Juan Luis Pérez-Navero. **PERFIL DE CITOQUINAS Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN PLASMÁTICAS EN NIÑOS CON TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA.** 65 Congreso de la Asociación Española de Pediatría, 1, 2 y 3 de junio de 2017.

5-Fernando Gil Hernández, Antonio R. Gómez-Fernández, Juan Luis Pérez-Navero, Katherine Flores-Rojas, María José de la Torre Aguilar, Concepción Martín-Domingo, J, Mercedes Gil-Campos. **EL TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA NO ESTÁ ASOCIADO A TOXICIDAD POR MERCURIO.** 65 Congreso de la Asociación Española de Pediatría, 1, 2 y 3 de junio de 2017.

6-Cristina Pérez García, Antonio R. Gómez-Fernández, Katherine Flores-Rojas, G Gil Hernández, María José de la Torre Aguilar, Juan Luís Pérez Navero, Mercedes Gil Campos. **¿NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR MERCURIO EN EL TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA?** XVII Congreso de la Sociedad Española de Investigación en Nutrición y Alimentación en Pediatría. 6 y 7 octubre de 2017

7-Antonio R. Gómez-Fernández, Mercedes Gil Campos, María José de la Torre Aguilar, Katherine Flores-Rojas, M. Cruz Rico, Pilar Matín Borreguero, Juan Luis Pérez-Navero. **PERFIL DE CITOQUINAS Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN PLASMÁTICAS EN NIÑOS CON TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA.** CVII Reunión de la Sociedad de Pediatría de Andalucía Occidental y Extremadura. 25 de Noviembre de 2017.

8-Antonio R. Gómez-Fernández, Cristina Pérez García, F. Gil Hernández, Katherine Flores-Rojas, Concepción Martín-Domingo, María José de la Torre Aguilar, Juan Luís Pérez Navero. **EL TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA NO ESTÁ ASOCIADO A TOXICIDAD POR MERCURIO.** CVII Reunión de la Sociedad de Pediatría de Andalucía Occidental y Extremadura. 25 de Noviembre de 2017.

9-Oscar Daniel Rangel-Huerta, Antonio Gomez-Fernández, Katherine Flores-

Rojas, Angel Gil, María José de la Torre-Aguilar, Juan Perez-Navero, Mercedes Gil-Campos. **PLASMA METABOLIC PROFILING IN AUTISTIC CHILDREN WITH OR WITHOUT MENTAL REGRESSION: A CONTROLLED PROSPECTIVE OBSERVATIONAL CASE-CONTROL STUDY.** IV World Congress of Public Health Nutrition y el XII Congreso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) – NUTRIMAD 2018. Madrid, del 24 al 27 de octubre de 2018.

10-Gomez-Fernández AR, de la Torre-Aguilar MJ, Perez-Navero JL, Flores-Rojas K, Matín-Borreguero P, Olivares M, Gil-Campos M. **EFICACIA Y SEGURIDAD DEL ÁCIDO DOCOXAHENOICO EN EL TRATAMIENTO COADYUVANTE DE NIÑOS CON TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA.** XIX Congreso de la Sociedad Española de Investigación en Nutrición y Alimentación en Pediatría. 4 y 5 de octubre de 2019.